



Università degli Studi di Pisa

Dipartimento di Scienze Veterinarie

Corso di Laurea Specialistica in Medicina Veterinaria

Tesi di Laurea

***Identificazione di prodotti ittici etnici a base di
medusa attraverso analisi molecolare del gene COI
mitocondriale***

Candidato:

Giusti Alice

Relatore:

Prof.ssa Alessandra Guidi

Correlatore:

Dott. Andrea Armani

ANNO ACCADEMICO 2012-2013

INDICE

RIASSUNTO/ABSTRACT	6
INTRODUZIONE	7
CAP. 1 LE MEDUSE: BIOLOGIA E RIPRODUZIONE	10
1.1 IL PHYLUM CNIDARIA	10
1.1.1 LA CLASSE SCYPHOZOA	12
1.1.2 Ciclo biologico	13
1.2 ORDINE DELLE RHIZOSTOMEAE	14
1.2.1 Famiglia Cassiopeidae	14
1.2.2 Famiglia Catostylidae	15
1.2.3 Famiglia Cepheidae	17
1.2.4 Famiglia Lobonematidae	17
1.2.5 Famiglia Lychnorhizidae	18
1.2.6 Famiglia Mastigiidae	19
1.2.7 Famiglia Rhizostomatidae	20
1.2.8 Famiglia Stomolophidae	24
1.2.9 Famiglia Thysanostomatidae	25
1.2.10 Famiglia Versurigidae	25
1.3 ORDINE DELLE SEMAEOSTOMEAE	26
1.3.1 Famiglia Pelagiidae	26
1.3.2 Famiglia Cyaneidae	27
1.3.3 Famiglia Ulmaridae	28
CAP. 2 LA MEDUSA: DA PIATTO TRADIZIONALE A BUSINESS	29
2.1 LE SPECIE COMMESTIBILI	29
2.2 PRODUZIONE E CONSUMO DI MEDUSA A LIVELLO MONDIALE	33
2.2.1 Tra tradizione e nuove tendenze: la pesca e l'acquacoltura	36
2.3 PREPARAZIONE DEI PRODOTTI A BASE DI MEDUSA	37
2.3.1 Effetti avversi legati al consumo di medusa: l' Alluminio	43
2.3.2 Rischi microbiologici	47
CAP. 3 SICUREZZA DEGLI ALIMENTI E NORMATIVA COMUNITARIA	48
3.1 LE TAPPE DELLA SICUREZZA ALIMENTARE NELL'UE	48
3.1.1 La Rintracciabilità degli alimenti	50
3.1.2 I nuovi obblighi degli operatori del settore alimentare	50
3.1.3 I materiali e gli oggetti destinati a venire in contatto con i prodotti alimentari (MOCA)	51
3.1.4 L'analisi del rischio	52
3.1.5 L'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA)	53
3.2 IL PACCHETTO IGIENE	54
3.3 L'ETICHETTATURA DEI PRODOTTI ALIMENTARI A LIVELLO COMUNITARIO	64

CAP. 4 NORMATIVA COMUNITARIA PER I PRODOTTI DELLA PESCA	71
4.1 LO STATO DI CONSERVAZIONE DEI PRODOTTI ITTICI	75
4.2 PERICOLI ALIMENTARI DEI PRODOTTI: IDONEITÀ AL CONSUMO UMANO	78
4.2.1 Pericoli chimici	78
4.2.2 Pericoli biologici	80
4.3 ETICHETTATURA E TRACCIABILITÀ DEI PRODOTTI ITTICI	81
4.3.1 Etichettatura prodotti a base di medusa: evoluzione normativa e problematiche di tracciabilità	86
 CAP. 5 IDENTIFICAZIONE DI SPECIE NEI PRODOTTI A BASE DI PESCE	 88
5.1 TECNICHE DI LABORATORIO PER L'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE	89
5.1.1 Cenni sulla struttura del DNA e sull'espressione genica	92
5.1.2 Il DNA mitocondriale (mtDNA)	94
5.1.3 Geni mitocondriali	95
5.2 METODICHE DI ESTRAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI	97
5.3 VALUTAZIONE QUALITÀ DNA TOTALE ESTRATTO, MISURAZIONE SPETTROFOTOMETRICA	99
5.4 LA REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI (PCR)	99
5.4.1 Applicazioni alternative della tecnica di PCR	102
5.4.2 Modificazioni chimiche del DNA negli alimenti	102
5.4.3 Contaminanti e inibizione della PCR	103
5.4.4 Elettroforesi	105
5.4.5 Purificazione dei prodotti di PCR	106
5.5 SEQUENZIAMENTO DEL DNA ED ANALISI FILOGENETICA	107
5.5.1 Il concetto di filogenesi	107
 CAP. 6 MATERIALI E METODI	 109
6.1 RACCOLTA DEI CAMPIONI DI MEDUSA, MISURAZIONE DEL pH E QUANTIFICAZIONE ALLUMINIO	109
6.1.1 Campioni di riferimento	109
6.1.2 Prodotti commerciali	110
6.1.3 Misurazione del pH e dell'Alluminio totale	112
6.2 ESTRAZIONE DEL DNA TOTALE CON IL PROTOCOLLO STANDARD	112
6.2.1 Trattamento preliminare	112
6.2.2 Estrazione del DNA totale	112
6.3 QUANTIFICAZIONE SPETTROFOTOMETRICA E VALUTAZIONE DELL'INTEGRITÀ DEL DNA TOTALE MEDIANTE ELETTROFORESI SU GEL D'AGAROSIO	113
6.3.1 Misurazione della concentrazione del DNA estratto	113
6.3.2 Elettroforesi del DNA totale su gel d'Agarosio	114
6.4 ANALISI DELLE SEQUENZE DI RIFERIMENTO, DISEGNO DEI PRIMER, OTTIMIZZAZIONE DEL PROTOCOLLO DI PCR PER L'AMPLIFICAZIONE DEL FRAMMENTO DI FOLMER DEL GENE MITOCONDRIALE COI	114
6.4.1 Disegno dei primer	114
6.4.2 Utilizzo della Siero Albumina Bovina (BSA)	116
6.4.3 Protocollo di amplificazione, sequenziamento ed analisi delle sequenze dei campioni freschi	116
6.5 ANALISI MOLECOLARE DEI CAMPIONI DI DNA DAI PRODOTTI COMMERCIALI	117
6.5.1 Disegno dei primer reverse interni per l'amplificazione del frammento corto del gene COI	117
6.5.2 Amplificazione del DNA dei prodotti commerciali	119

6.5.3 Valutazione degli inibitori della PCR e sviluppo di un metodo per l'estrazione del DNA dai prodotti commerciali	119
6.5.4 Sviluppo del metodo per l'estrazione del DNA dai prodotti commerciali	119
6.5.5 Protocollo di amplificazione finale, sequenziamento ed analisi delle sequenze dei prodotti Commerciali	120
6.5.6 Analisi filogenetica	120

CAP. 7 RISULTATI E DISCUSSIONI **122**

7.1. MISURAZIONE DEL pH E QUANTIFICAZIONE DELL'ALLUMINIO	122
7.1.1 Misurazione del pH e quantificazione dell'Alluminio	122
7.2 ESTRAZIONE DNA TOTALE: CONCENTRAZIONE E QUALITA' DEL DNA ESTRATTO	125
7.2.1 Valutazione spettrofotometrica e resa	125
7.2.2 Valutazione dell'integrità del DNA mediante elettroforesi su gel d'Agarosio	125
7.3 ANALISI DELLE SEQUENZE E VALUTAZIONE DELL'EFFICIENZA DEI PRIMER PER L'AMPLIFICAZIONE DEL FRAMMENTO DI FOLMER SUL GENE MITOCONDRIALE <i>COI</i>	126
7.3.1 Utilizzo della Siero Albumina Bovina (BSA) per migliorare la performance di amplificazione	129
7.4. PROGETTAZIONE DEI PRIMER REVERSE INTERNI PER L'AMPLIFICAZIONE DI FRAMMENTI INTERNI ALLA SEQUENZA FOLMER	129
7.5 LA VALUTAZIONE DEGLI INIBITORI DELLA PCR NEL DNA DEI CAMPIONI PC	130
7.6 OTTIMIZZAZIONE DEL PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE ED AMPLIFICAZIONE DEI CAMPIONI COMMERCIALI	131
7.7 ANALISI FILOGENETICA	135
7.8 MISLABELING	136

CAP. 8 CONCLUSIONI **139**

BIBLIOGRAFIA **140**

RIFERIMENTI NORMATIVI **152**

RINGRAZIAMENTI **160**

RIASSUNTO

La medusa è un alimento molto antico ampiamente consumato nella cucina tradizionale asiatica. Attualmente, in relazione all'evoluzione dei mercati globali, ai flussi migratori cinesi e, non da ultimo, al diffondersi nella nostra società di nuovi trend alimentari, questi prodotti vengono commercializzati anche nei Paesi Occidentali. La maggior parte delle meduse commestibili, appartenenti all'Ordine delle *Rhizostomeae*, vengono commercializzate sotto forma di prodotti in salamoia, oppure di prodotti dissalati direttamente pronti al consumo (*ready to eat*). Fra le specie più utilizzate, alcune, come *Rhopilema esculentum* e *Nemopilema nomurai*, sono sfruttate da secoli in Asia, mentre altre sono state utilizzate solo di recente. Uno dei problemi legati all'ispezione dei prodotti a base di medusa è legato al fatto che, a causa della perdita delle loro caratteristiche morfologiche durante la lavorazione, risulta impossibile effettuare un'identificazione di specie. Per questo motivo si rende necessario ricorrere a metodiche di laboratorio e, in questo settore, quelle maggiormente utilizzate sono quelle basate sull'analisi degli acidi nucleici. In questo lavoro, è stato sviluppato un protocollo di estrazione del DNA da prodotti contenenti alte concentrazioni di sali che, comportandosi da inibitori, avevano la capacità di ridurre l'efficienza della reazione di amplificazione. Inoltre, considerando anche lo stato di degradazione del DNA osservato nei campioni commerciali, probabile conseguenza basso pH dei prodotti, sono stati progettati differenti primer in grado di amplificare frammenti di lunghezza differente appartenenti al gene mitocondriale che codifica per la subunità I della Citocromo C Ossidasi (*COI*). I protocolli sono stati quindi utilizzati per il sequenziamento del DNA estratto da 57 campioni provenienti da specie identificate e da 78 campioni commerciali acquistati presso le comunità cinesi di Prato, Milano e Roma. L'analisi filogenetica effettuata utilizzando il metodo *Neighbor-joining*, su un frammento di 142bp del gene *COI* ha consentito un'identificazione a livello di specie, mettendo in evidenza una percentuale allarmante di *mislabeling*, soprattutto per quanto riguarda i prodotti *ready to eat*.

Keywords: medusa, prodotti salati, identificazione di specie, analisi filogenetica, gene *COI*.

ABSTRACT

The jellyfish is a very ancient food widely consumed in the traditional Asian cuisine. Currently, due to the evolution of the markets, the Chinese migration flows and the spread in our society of new food trends, these products are also sold in Western countries. Most of the edible jellyfish, belonging to the Order of *Rhizostomeae*, are marketed in the form of salted products, or already desalted ready for consumption (*ready to eat*). Some of the most used species, such as *Rhopilema esculentum* and *Nemopilema nomurai*, have been exploited for centuries in Asia, while others have been used only recently. One of the problems related to the inspection of products based on jellyfish is related to the fact that, due to the loss of their morphological characteristics during processing, it is impossible to perform an identification of species. For this reason it is necessary to rely on laboratory methods. In this field, the most used are those based on the analysis of nucleic acids. In this work, a protocol for the DNA extraction from products containing high concentrations of salts has been developed. In fact, salts can act as inhibitors, reducing the efficiency of the amplification reaction. Moreover, considering the state of degradation of DNA observed in commercial samples, probably due to the low pH of the products, different primers have been designed, capable to amplify fragments of different lengths belonging to the mitochondrial gene encoding the subunit I of Cytochrome C oxidase (*COI*). The procedures were then used for the sequencing of the DNA extracted from 57 samples from identified species and 78 commercial samples purchased in the Chinese community of Prato, Milan and Rome. The phylogenetic analysis performed using the *Neighbor-joining* method on a fragment of 142bp of the *COI* gene allowed the identification at the species level and permitted to highlight an alarming proportion of *mislabeling*, especially among the *ready to eat* products.

Keywords: jellyfish, salted products, species identification, phylogenetic analysis, *COI* gene

INTRODUZIONE

La medusa è un alimento molto antico ampiamente diffuso, consumato ed apprezzato nella cucina tradizionale asiatica.

Se la pesca e l'utilizzo per scopi alimentari della medusa sono nati in Cina, dove da sempre questo alimento ha rappresentato una vera e propria tradizione gastronomica, a partire dagli anni '70 i prodotti a base di medusa hanno varcato i confini cinesi e sono stati ampiamente sfruttati in tutto il Continente asiatico, in particolare nel Sud-Est, dando vita ad un business da milioni di dollari.

Attualmente, in relazione all'evoluzione dei mercati globali, al fenomeno dei flussi migratori internazionali cinesi, che hanno dato vita alle ormai diffusissime "China-Town" e, non da ultimo, al diffondersi, tra i consumatori occidentali, di nuovi trend alimentari come la ricerca di cibi light, salutistici ed "esotici", questi prodotti vengono commercializzati anche nei Paesi Occidentali.

La maggior parte delle meduse commestibili appartiene all'Ordine delle Rhizostomeae (Cnidaria: Scyphozoa) le quali, a seguito di particolari lavorazioni tradizionali, vengono commercializzate sotto forma di prodotti in salamoia, da consumare previa desalatura in acqua, oppure già desalate e direttamente pronte al consumo (*ready to eat*). Alcune specie, come *Rhopilema esculentum*, *Rhopilema hispidum* e *Nemopilema nomurai* sono sfruttate da secoli in Asia mentre altre, hanno cominciato ad essere considerate quali possibile risorsa alimentare solo di recente. Per altre ancora, ad oggi non considerate in letteratura fra le specie commestibili, non si esclude che, date le loro caratteristiche, possano esserlo in futuro, dal momento che, in alcuni Paesi, sono già stati fatti studi al riguardo.

La tecnica di lavorazione della medusa si basa essenzialmente sull'utilizzo di una miscela di sale ed allume, nella quale, una volta pescati, gli animali vengono mantenuti per tempi variabili a seconda della parte anatomica, della specie e della dimensione. Nonostante la medusa costituisca un prodotto salutare, addirittura terapeutico, il prodotto trasformato potrebbe invece costituire un rischio sanitario per il consumatore se consumato in quantità eccessiva. Infatti, uno dei principali problemi legati alla tecnica di lavorazione è dovuta alla quantità di alluminio che residua nel prodotto finito.

Un altro problema legato alla lavorazione delle meduse è legato al fatto che, a causa della perdita delle loro caratteristiche morfologiche durante la preparazione dei prodotti commerciali, risulta impossibile effettuare un'identificazione di specie e questo comporta evidenti problemi ispettivi dal punto di vista della tracciabilità dei prodotti. Infatti, la

vigente normativa in campo di etichettatura e tracciabilità dei prodotti della pesca prevede che il consumatore sia obbligatoriamente informato riguardo alla denominazione commerciale, alla zona di cattura e al metodo di produzione del prodotto. La vasta diversificazione dell'offerta associata al settore ittico lo espone, più facilmente rispetto agli altri comparti produttivi, a frodi commerciali da sostituzione di specie con altre di minor valore o a frodi sanitarie. Non essendo possibile effettuare un riconoscimento di tipo morfologico si rende necessario, per l'identificazione della specie, ricorrere a metodiche di laboratorio. Le tecniche più innovative e maggiormente utilizzate sono quelle basate sull'analisi degli acidi nucleici. Il DNA infatti, in quanto molecola depositaria di tutto il patrimonio genetico, rappresenta una vera e propria carta d'identità di un individuo che lo contraddistingue inequivocabilmente da qualsiasi altro. Il DNA mitocondriale, in particolare, rappresenta la molecola d'elezione per le applicazioni di biologia molecolare al fine del riconoscimento di specie e le sequenze "target" sono quelle dei geni che codificano per le subunità dell'RNA ribosomiale (12srRNA-16srRNA) sia quelli che codificano per le 3 subunità della Citocromo C Ossidasi (in particolare per la Citocromo C Ossidasi I-COI) e per il citocromo b (*cyt b*).

Isolando dunque tale DNA dai tessuti, amplificando specifici tratti genici mediante tecnica PCR, sequenziando i prodotti di amplificazione ed effettuando un'analisi delle sequenze ottenute attraverso un confronto con apposite banche dati on-line è possibile, con un elevato grado di certezza, identificare la specie. In particolar modo l'analisi BLAST e quella filogenetica sono quelle maggiormente utilizzate nel caso in cui non sia possibile sviluppare una metodica rapida per l'identificazione.

Purtroppo, nell'ambito dei prodotti alimentari, l'applicazione delle metodiche molecolari, ed in particolar modo della PCR, può essere ostacolata non soltanto dalla presenza di sostanze, spesso aggiunte dalla lavorazione, che agiscono come inibitori della reazione ma anche dalla degradazione degli acidi nucleici indotta dal pH o dalle alte temperature applicate all'alimento.

In questo lavoro, è stato sviluppato un protocollo di estrazione del DNA per prodotti contenenti alte concentrazioni di sali, in quanto si è constatato che questi ultimi, tendono a comportarsi da inibitori nei confronti dell'amplificazione, riducendone notevolmente l'efficienza. Inoltre, considerando lo stato di degradazione del DNA osservato nei campioni commerciali in seguito ai trattamenti subiti nei lunghi processi produttivi durante i quali vengono mantenuti a condizioni di pH molto basse, sono state progettate quattro serie di primer per l'amplificazione di frammenti di lunghezza differente appartenenti al gene mitocondriale che codifica per la subunità I della Citocromo C

Ossidasi (COI). Questi primers sono stati utilizzati per l'amplificazione ed il sequenziamento del DNA estratto da 57 esemplari appartenenti a specie identificate raccolte grazie alla collaborazione di enti di ricerca internazionali e da 78 campioni commerciali acquistati presso le comunità cinesi di Prato, Milano e Roma.

L'analisi filogenetica effettuata utilizzando il metodo *Neighbor-joining*, su un frammento di 142bp del gene COI, ha consentito un'identificazione a livello di specie mettendo in evidenza una percentuale allarmante di errore di etichettatura, soprattutto per quanto riguarda i prodotti *ready to eat*.

CAPITOLO 1

LE MEDUSE: BIOLOGIA E RIPRODUZIONE

Tutte le meduse ad oggi conosciute e classificate appartengono al Phylum Cnidaria. All'interno di questo Phylum il maggior numero di specie (circa 200), nonché quelle di dimensioni maggiori, sono inserite nella Classe Scyphozoa (Schiariti *et al.*, 2012). Si tratta di organismi che abitano gli oceani ed i mari di tutto il mondo, dalle zone temperate, ai tropici, alle fredde acque artiche ed antartiche, anche se la maggior parte di essi predilige le zone costiere poco profonde ed i climi caldi (Hale, 1999).

Nonostante l'estesa distribuzione e la variegata diversità, ad oggi, le conoscenze relative a queste specie sono relativamente esigue; gran parte di ciò che attualmente si conosce sulla fisiologia ed il ciclo biologico delle meduse origina infatti da studi effettuati in seguito ai disagi causati dai fenomeni delle “fioriture”, che hanno provocato ingenti danni alla pesca ed al turismo in tutto il mondo, rendendo da sempre difficile la coesistenza di questi animali con l'uomo (Arai, 1997).

1.1 IL PHYLUM CNIDARIA

Il Phylum Cnidaria (o Coelenterata), al quale appartengono idre, polipi, meduse, attinie, madrepore e coralli, è suddiviso in 4 classi: Anthozoa, Scyphozoa, Hydrozoa e Cubozoa. Si tratta, in generale, di organismi diploblastici, costituiti cioè da solo due foglietti embrionali primari: *endoderma*, dal quale originano epidermide e derivati, tessuti nervosi e recettori sensoriali ed *ectoderma*, che andrà a formare l'epitelio del canale alimentare. A differenza di tutti gli altri gruppi animali non presentano il *mesoderma*, dal quale si formano gli organi interni e lo scheletro. Tra epidermide e canale alimentare è presente la *mesoglea*, costituita da una matrice gelatinosa di fibre elastiche e cellule ameboidi, il cui spessore varia nell'ambito delle diverse classi: da molto sottile (Hydrozoa) a notevolmente spesso (Scyphozoa). Il corpo contiene un'unica cavità, il *coelenteron* (da cui il termine “celenterati”) detto anche cavità gastrovascolare, che è in contatto con l'acqua circostante attraverso la bocca e nel quale avvengono gli scambi gassosi con l'esterno, la digestione e la liberazione dei gameti. All'interno della cavità gastrovascolare è inoltre presente uno scheletro idrostatico, ovvero una colonna liquida mantenuta in sede dai muscoli della regione orale la cui pressione è regolata dai muscoli di ectoderma ed endoderma. (Hale, 1999; Hickman *et al.*, 2001).

Gli cnidari, tutti carnivori, sono muniti, soprattutto a livello dei tentacoli, di cellule

urticanti, gli *cnidociti*, con le quali catturano le loro prede. Ciascun cnidocita è munito di una capsula contenente un liquido tossico (ipnotossina), e un filamento urticante, il *nematocita*, avvolto a spirale. All'esterno del cnidocita è presente una piccola terminazione sensoria, lo *cnidociglio*, che se stimolata fa estroflettere il nematocita permettendo la predazione o la difesa. L'alimento predato viene introdotto attraverso la bocca nella cavità gastrovascolare e qui digerito. La digestione è in parte extracellulare (le cellule che rivestono la cavità riversano in essa enzimi che consentono la digestione di proteine e carboidrati) ed in parte intracellulare (le cellule stesse sono in grado di catturare per fagocitosi piccole particelle di cibo e completare la digestione nel loro interno). I residui della digestione e i prodotti di rifiuto vengono eliminati attraverso l'apertura buccale, non essendo presenti organi preposti all'escrezione.

Gli Cnidari si riproducono sia per via *agamica* (scissione o gemmazione) che per via *gamica* (per mezzo di gameti) e le due forme adulte sotto cui si presentano sono quella di **polipo** (forma fissa) e quella di **medusa** (forma libera e natante). Quando il ciclo biologico dello cnidario comprende sia lo stadio di polipo che di medusa si parla di "alternanza di generazioni".

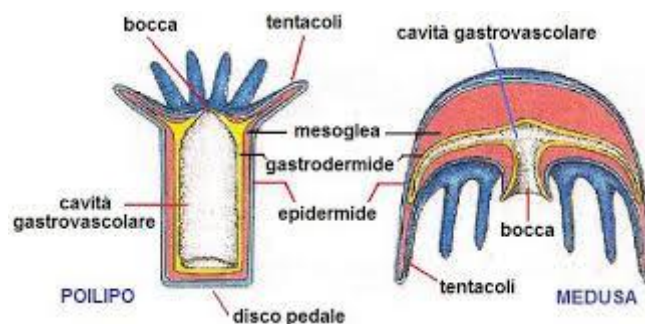


Fig.1.1: Struttura di cnidari in sezione. Fonte: www.macosa.dima.unige.it

Gli cnidari possono presentare infatti 3 tipi fondamentali di ciclo biologico:

1. Solo stadio di medusa (raro);
2. Sia polipo sia medusa (il più comune), con alternanza di una generazione agamica, rappresentata dal polipo, ed una gamica rappresentata dalla medusa;
3. Solo polipo (Anthozoa e Hydrozoa). Anemoni di mare, coralli e idroidi sono infatti tutti polipi che crescono associati a rocce o altre superfici dure del mare.



Fig 1.2: Schema relativo ai tipi di ciclo biologico nelle diverse classi di Celenterati.
 Tratto da www.isegretidelmare.it

1.2. LA CLASSE SCYPHOZOA

Le “vere meduse” (Hale, 1999) appartengono alla Classe Scyphozoa e sono organismi caratterizzati da un corpo a forma di campana o di ombrello (dal greco *skyphos*, coppa) e dotati di una estrema variabilità interspecifica da un punto di vista delle dimensioni, delle forme e dei colori. Le dimensioni, che in generale oscillano tra i 2 e i 40 cm, possono raggiungere anche i 2 metri di diametro. La più grande di tutte, che può superare i 2 metri di diametro e può avere tentacoli lunghi anche 40 metri, appartiene al genere *Cyanea*. In base alle differenze morfologiche e di distribuzione la classe Scyphozoa è suddivisa in 4 ordini, *Coronatae*, *Semaeostomae*, *Rhizostomae* e *Stauromedusae*, all’interno dei quali si ritrovano 24 famiglie, 71 generi ed oltre 220 specie (Hale, 1999).

La struttura di base è quella degli cnidari, con un ectoderma ed un endoderma fra i quali è interposto lo strato della mesoglea; quest’ultimo, essendo notevolmente spesso, conferisce all’animale un aspetto gelatinoso ed è proprio per questa caratteristica che, nel linguaggio internazionale, la medusa viene definita “*jellyfish*”, pesce gelatina (Hale, 1999).

Il margine della campana è tipicamente ondulato e forma dagli 8 ai 16 lobi, detti *lembi* e può possedere gli cnidociti, che tuttavia sono localizzati soprattutto a livello dei tentacoli.

La bocca, posta al termine di una protuberanza tubulare a forma di imbuto (*manubrium*), occupa una posizione centrale sul lato concavo del corpo ed è circondata da 4-8 *braccia orali*, spesso frangiate. Queste ultime hanno la funzione di convogliare il cibo catturato dai tentacoli alla bocca e, attraverso questa, alla cavità gastrovascolare (*coelenteron*), che appare ripartita in 4 *tasche gastrali* divise tra loro da altrettanti setti (a livello dei quali si trovano anche le gonadi); il margine del setto che è rivolto verso la parte centrale del *coelenteron* porta proiezioni tissutali, dette *filamenti gastrali*, contenenti gli cnidociti ed altre cellule ghiandolari.

Il sistema nervoso presenta una struttura tendenzialmente elementare ed è costituito principalmente da una serie di recettori fotosensibili ed organi di equilibrio (*statocisti*), distribuiti intorno a delle strutture sensoriali disposte ai margini della campana chiamate *ropali* (Hale, 1999); ciascun ropalio è associato ad un ciglio sensoriale. Ogni cambiamento

direzionale nello spazio determina una compressione della statocisti contro il ciglio tributario e la generazione potenziali d'azione, innescando un meccanismo che permette all'animale di orientarsi (Arai, 1997). Da notare che la centralizzazione di un sistema nervoso, con la formazione di un cervello, avrebbe scarso valore adattativo per un animale a simmetria radiale: le meduse, infatti, si relazionano con l'ambiente esterno nello stesso modo da qualunque parte del corpo (Hickman *et al.*, 2001).

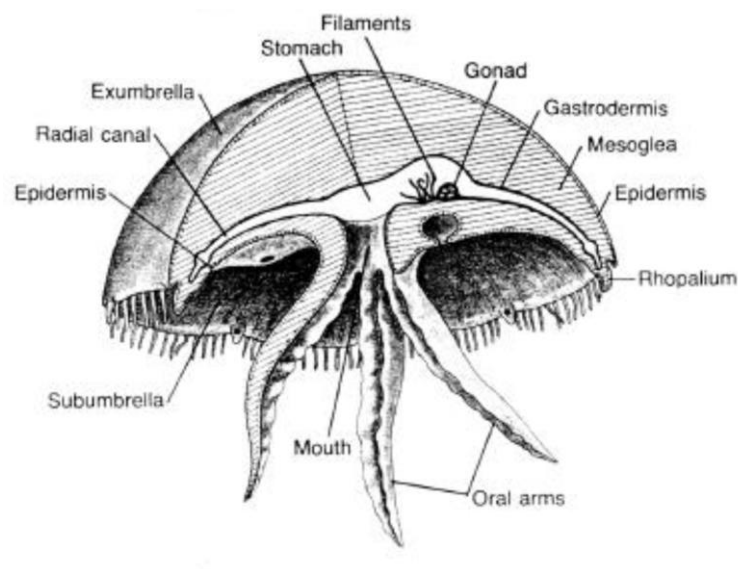


Fig.1.3: Medusa comune in sezione. Fonte: Hale, 1999

1.2.1. Ciclo biologico (Hale, 1999)

Come accennato precedentemente il ciclo biologico della classe Scyphozoa alterna una fase polipoide agamica (minuta e di breve durata) ed una medusoide gamica (nettamente preminente).

Il **polipo** (o *schiphistoma* o *schifopolipo*) ha la forma di un calice o di una coppa con un corto peduncolo e possiede normalmente 4 tentacoli; da esso si generano per *gemmazione* altri polipi e, in particolari periodi dell'anno, sotto l'influenza di fattori ormonali ed ambientali, esso produce meduse tramite un fenomeno, conosciuto come *strobilazione*, che consiste in una serie di divisioni trasversali del corpo a partire dall'estremità orale. Al termine della strobilazione ogni polipo produce dalle 10 alle 20 **efire**, ossia giovani meduse di dimensioni ridottissime (1-3 mm) in cui è già riconoscibile il *manubrium*, con un'apertura boccale centrale. Le efire sono destinate a diventare, nel giro di poche settimane, **meduse adulte**.

Queste ultime sono in genere organismi a sessi separati (anche se esistono esemplari ermafroditi) le cui gonadi sono poste sui due lati di ciascun setto gastrale. La fase della

riproduttiva prevede l'espulsione, attraverso l'apertura orale, delle uova da parte della femmina e degli spermatozoi da parte del maschio con la successiva fecondazione esterna, nell'ambiente acquatico. A seguito della fecondazione si sviluppa la **planula**, una particolare larva liberamente natante che poi si fissa sul fondale formando nuovi polipi.

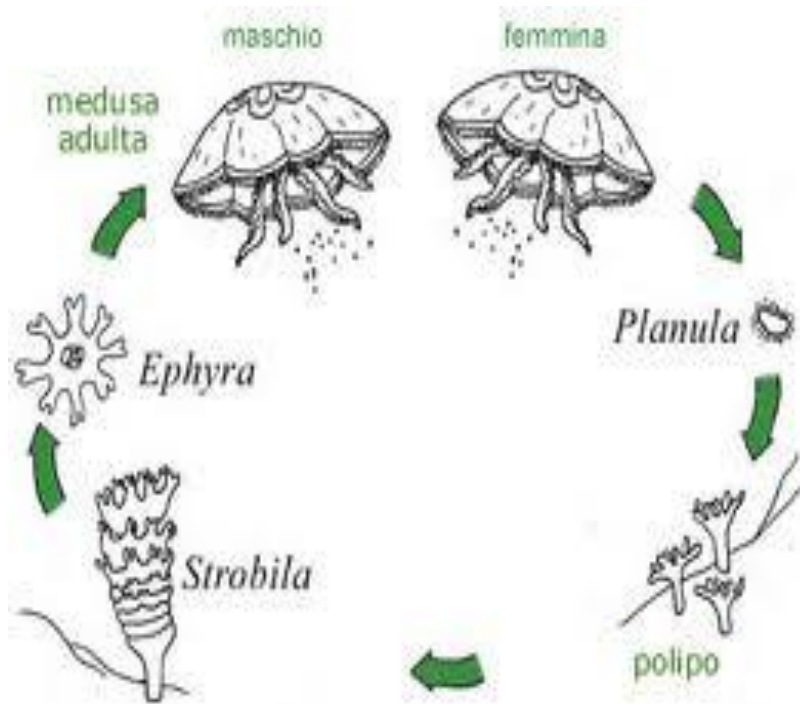


Fig 1.4: rappresentazione grafica del ciclo biologico. Immagine tratta da www.riservamarinamiramare.it

1.3. ORDINE DELLE RHIZOSTOMEAE

All'Ordine delle Rhizostomeae appartengono 10 distinte famiglie: *Cassiopeidae*, *Catostylidae*, *Cepheidae*, *Lobonematidae*, *Lychnorhizidae*, *Mastigiidae*, *Rhizostomatidae*, *Stomolophidae*, *Thysanostomatidae* e *Versurigidae*. Tutti gli organismi appartenenti all'ordine presentano una campana priva di tentacoli, con quattro paia di braccia orali fuse tra loro in un manubrio suddiviso in moltissimi canali intercomunicanti ed aperti esternamente, sono inoltre sprovvisti di una vera e propria cavità buccale, e il cibo viene convogliato direttamente nello stomaco dell'animale attraverso queste molteplici incanalature. I margini della campana sono suddivisi in otto o più lobi (lombi), sui quali sono disposti gli organi sensoriali (ropali). La riproduzione è quella tipica della Classe Scyphozoa, con una fase polipoide agamica alternata ad una medusoide gamica (Hale, 1999).

1.3.1 Famiglia Cassiopeidae (L. Agassiz, 1862)

Appartiene a questa famiglia il solo genere *Cassiopea*, le cui specie principali sono rappresentate da *C. andromeda* (Forsk., 1775), *C. frondosa* (Pallas, 1774), *C. ornata* (Haeckel, 1880) e *C. xamachana* (Bigelow, 1892). In generale, queste specie sono tutte caratterizzate dalla presenza di numerosissime aperture buccali a livello delle quattro paia di braccia orali. La campana ha una forma tendenzialmente appiattita di un colore variabile dal marrone al grigio-blu fino al verdognolo (Sterrer, 1986). La particolarità delle *Cassiopeidae* risiede nella presenza, soprattutto a livello delle braccia orali, di particolari alghe simbiotiche (zooanthella) che sono fondamentali per la sopravvivenza della medusa in quanto, in condizione di luce sufficiente, attuano i processi di fotosintesi necessari alla produzione di composti organici indispensabili. Differentemente dalle altre meduse, inoltre, esse vivono adagiate sul fondale marino, con la campana rivolta verso il basso (a contatto col fondale) e le braccia orali verso l'alto in modo da favorire appunto l'esposizione alla luce degli organismi simbiotici (Hale, 1999). La maggior parte delle *Cassiopeidae* è distribuita in modo circumtropicale nelle acque atlantiche occidentali e in quelle indo-pacifiche, ma si ritrovano anche nel Mar Rosso e, in tempi più recenti, nel Mar Mediterraneo (Schembri *et al.*, 2010). In particolare, secondo gli studi tassonomici effettuati da Holland *et al.* (2004) basati sulla caratterizzazione molecolare del gene mitocondriale che codifica per l'enzima citocromo-ossidasi I (COI), risulta che gli esemplari presenti nel Mar Rosso appartenerebbero alla specie *C. andromeda*, la quale può essere considerata una delle prime meduse "migranti" che, a seguito dell'apertura del Canale di Suez (1869) si è distribuita nelle acque mediterranee (in particolare, *C. andromeda* si è stabilizzata nel Mar Egeo (Galil *et al.*, 1990). Sempre secondo questi studi, *C. frondosa* sarebbe maggiormente distribuita nelle acque atlantiche occidentali, mentre *C. ornata* in quelle indonesiane e delle isole Fiji. *C. xamachana* è invece distribuita soprattutto nel Golfo del Messico, nel Mare dei Caraibi e nelle acque delle Isole Bermuda (Sterrer, 1992).

Le diverse specie di *Cassiopea* sono molto simili da un punto di vista morfologico; l'unica differenza risiede probabilmente nelle dimensioni, più ridotte in *C. andromeda* (ca 12 cm di diametro) rispetto alle altre (ca 20 cm) (World Register of Marine Species: WoRMS www.marinespecies.org).

1.3.2 Famiglia Catostylidae (Gegenbaur, 1857)

Appartengono a questa famiglia molti generi di meduse, i più importanti dei quali sono *Catostylus spp.*, *Crambione spp.* e *Crambionella spp.*

Possiedono braccia orali a forma di foglia mentre la campana, di dimensioni variabili a seconda della specie, è generalmente di colore giallo-marrone a causa della presenza di numerosi organismi vegetali commensali (zooxantelle, alghe unicellulari fotosintetiche) sulla sua superficie mentre in assenza di organismi simbiotici assume una colorazione bluastra (Hale, 1999). Questa famiglia è distribuita soprattutto nelle acque indo-pacifiche, ma alcune specie si possono trovare anche lungo le coste occidentali dell'Africa e dell'Europa (Hale, 1999).

La specie *Catostylus mosaicus* (Quoy & Gaimard, 1824) è senz'altro la medusa più diffusa nelle acque australiane settentrionali ed orientali, dove si concentra soprattutto a livello delle foci dei fiumi (Dawson, 2005). La campana ha forma emisferica finemente granulata, ed ha un diametro di circa 35 cm; il colore varia a seconda della presenza o meno degli organismi commensali che, come precedentemente detto influiscono in maniera determinante sul colore di questi animali (WoRMS www.marinespecies.org). Infatti, secondo studi effettuati nelle acque australiane, *C. mosaicus* potrebbe presentarsi di colore blu (specie "conservativa") o di colore marrone (specie "simbiontica") in relazione all'habitat e alla presenza di organismi commensali (Dawson, 2005). Dello stesso genere, *C. tagi* (Haeckel, 1869), presente nelle acque dell'Oceano Atlantico Nord-orientale (soprattutto lungo le coste del Portogallo) e meridionale (WoRMS), può raggiungere le dimensioni di 50 cm (Hale, 1999).

Il genere *Crambionella* (la cui specie più rappresentativa è *C. orsini* (Vanhoffen, 1888)) abita soprattutto le acque dell'Oceano Indiano, ma è presente anche nel Golfo Arabico, lungo le coste del Kenya e nel Mar Rosso (WoRMS www.marinespecies.org); misura circa 15-16 cm di diametro, ed ha una campana liscia con numerosi lobi marginali di forma triangolare separati tra loro da numerosi solchi verticali; possiede otto braccia orali, la cui lunghezza eguaglia quella del diametro; il colore di queste meduse varia dal bianco al giallognolo (WoRMS www.marinespecies.org) e possono essere presenti delle linee violacee vicino al margine della campana (Kitamura & Omori, 2010). Si tratta di una specie pescata e regolarmente consumata nei paesi asiatici (Kitamura & Omori, 2010). *Crambione mastigophora* (Maas, 1903) è invece la specie più rappresentativa del genere *Crambione*; anch'esso presente quasi esclusivamente nelle acque dell'Oceano Indiano e del Pacifico occidentale, viene da sempre pescato e consumato quale alimento. La campana è liscia relativamente piatta e di colore giallognolo, e misura circa 25 cm di diametro. Come in *Crambionella*, essa possiede numerosi lobi marginali separati da altrettanti solchi ed otto braccia orali, lunghe quanto la campana (Kitamura & Omori, 2010).

1.3.3 Famiglia Cepheidae

I generi maggiormente rappresentativi di questa famiglia sono *Cephea* e *Cotylorhiza*.

Cephea cephea è distribuita soprattutto nelle zone tropicali dell'Oceano Atlantico Centro-orientale, nelle acque indo-pacifiche e nel Mar Rosso (WoRMS www.marinespecies.org).

La campana può raggiungere un diametro di 40 cm ed è di colore rosa-lilla sulla faccia superiore e marrone su quella inferiore. Sulla porzione centrale sono presenti 10-15 protuberanze di forma irregolare; le braccia orali sono ripiegate su se stesse e possiedono delle appendici filamentose alle estremità distali (WoRMS www.marinespecies.org).

Cotylorhiza tuberculata (Macri, 1778) è una medusa che abita le acque mediterranee in modo ubiquitario, con una concentrazione maggiore a livello del Mar Adriatico; originaria del Mar Rosso, è giunta nell'habitat attuale in seguito all'apertura del Canale di Suez (Galil *et al.*, 1990). La campana è tendenzialmente piatta, leggermente rialzata al centro e misura circa 30 cm; i margini sono tipicamente frastagliati. E' di colore giallo, talvolta verdastro per la presenza di zooxantelle, e possiede otto braccia orali ramificate e terminanti con un bottone apicale di colore blu/viola (Associazione Italiana Acquario Mediterraneo: AIAM www.aiamitalia.it).

1.3.4 Famiglia Lobonematidae

A questa famiglia appartengono due generi: *Lobonemoides* e *Lobonema*. Si tratta di meduse prettamente asiatiche, tipiche delle acque indo-pacifiche occidentali (Hale, 1999) che rientrano nelle meduse commestibili e che quindi vengono regolarmente pescate in queste zone a scopo alimentare (Kitamura & Omori, 2010). In particolare, *Lobonemoides robustus* (Stiasny, 1920) possiede una campana di 38-46 cm di diametro, tendenzialmente piatta, la parte superiore della quale è dotata di papille appuntite distribuite in modo caratteristico: nella porzione centrale della campana assumono infatti una forma piuttosto allungata, per poi accorciarsi man mano che si avvicinano alle estremità, fino a scomparire completamente a livello dei margini. Questi ultimi sono caratterizzati da numerosissime lobature lunghe e strette, simili a tentacoli. Le braccia orali sono otto, separate l'una dall'altra e dotate di lunghe appendici filiformi per tutta la loro lunghezza. Generalmente sono di colore bianco ma, qualche esemplare può assumere un caratteristico colore rosato (Kitamura & Omori, 2010). *Lobonemoides gracilis* (Light, 1914) è molto simile a *L. robustus*, ma di dimensioni ridotte, tanto che negli anni '60 era stato ipotizzato che si trattasse della forma giovanile di quest'ultimo (Kramp, 1961), anche perché ne condivide l'habitat, concentrandosi soprattutto nelle acque del Sud-Est Asiatico, dalle Filippine alla Birmania (Kitamura & Omori, 2010); ad oggi è considerata quale specie a sé, sebbene

ancora non se ne conosca molto (Kitamura & Omori, 2010) e le poche notizie riguardanti questo esemplare risalgano quasi esclusivamente agli studi di Light del 1914. Le suddette specie somigliano molto anche al genere *Lobonema*, che ha come unico rappresentante la specie commestibile *Lobonema smithii* (Mayer, 1910). Le caratteristiche comuni stanno nella forma e struttura della campana, il cui diametro può raggiungere i 50 cm (Omori & Nakano), nelle braccia orali, nonché nella distribuzione geografica (Kitamura & Omori, 2010). Come approfondito nel *paragrafo 3.1*, le *Lobonematidae* sono commercialmente conosciute come “Tipo Bianco” e sono le più pescate negli stati delle Filippine, del Vietnam, della Thailandia e della Birmania (Omori & Nakano, 2001).

1.3.5 Famiglia Lychnorhizidae

Il gruppo più numeroso di questa famiglia appartiene ai generi *Lychnorhiza* e *Pseudorhiza*. *Lychnorhiza lucerna* (Haeckel, 1880) è in assoluto la medusa più abbondante dell'Oceano Atlantico sud-occidentale (Mianzan, 1986), concentrandosi essenzialmente nelle acque che bagnano la costa occidentale del Sud-America, dalla Guiana Francese (5°N) a San Clemente del Tuyù (37° S) (Kramp, 1961). Abbondanti fioriture di questi esemplari sono state però osservate anche a livello dell'estuario del Rio de la Plata (Argentina) e delle zone limitrofe (35°-37° S) (Mianzan *et al.*, 2005; Colombo *et al.*, 2003). In queste zone, dove l'attività principale è rappresentata dalla pesca, i *blooming* hanno determinato non pochi inconvenienti con perdite economiche notevoli. Per questo motivo i pescatori locali hanno recentemente cominciato a pescarle a scopo commerciale per poi rivenderle sul mercato asiatico (Schiariti *et al.*, 2008)- (*paragrafo 3.1*). Dal punto di vista morfologico, *L. lucerna* presenta un aspetto diverso a seconda dello stadio vitale in cui si trova: le meduse più giovani, infatti, presentano una campana di forma emisferica che si mantiene tale fino a quando la medusa non raggiunge circa 7 cm di diametro; successivamente la campana tende ad appiattirsi, fino a raggiungere la forma discoidale caratteristica della medusa adulta, il cui diametro si aggira intorno ai 45 cm (tendenzialmente lo spessore è pari a 1/6 del diametro). Su tutta la superficie della campana è possibile osservare numerose proiezioni coniche della lunghezza di circa 1 mm, mentre i margini sono dotati di lembi triangolari. Questa specie possiede otto braccia orali di forma appiattita e provviste di numerosi filamenti a livello delle estremità distali la cui lunghezza raggiunge i 2/3 del diametro della campana. Il colore è molto variabile: gli esemplari presenti nelle acque argentine (36° S) sono di colore uniforme, bianco o marrone molto pallido, mentre quelli presenti in Brasile possono presentare macchie distribuite asimmetricamente sulla superficie della campana di colore marrone più scuro (Marine Species Identification Portal

www.species-identification.org), alcuni esemplari sono addirittura di colore blu (Humann, 1992). Anche le braccia orali possono variare dal bianco al marrone (Marine Species Identification Portal www.species-identification.org).

Pseudorhiza haeckeli (Haacke, 1884) è una medusa che abita le acque dell'Australia meridionale. La campana, di aspetto rugoso, misura circa 30-40 cm (World Register of Marine Species: WoRMS www.marinespecies.org).

1.3.6 Famiglia Mastigiidae

I principali esemplari appartenenti a questa famiglia appartengono al genere *Mastigias* e *Phyllorhiza*. Entrambi sono originari delle acque asiatiche, ma sono poi stati introdotti in habitat diversi, per via naturale o perchè accidentalmente trasportati in altre zone con mezzi marittimi. In particolare, *Mastigias papua* (Lesson, 1830) e *Phyllorhiza punctata* (von Lendenfeld, 1884) sono originarie dell'area indo-pacifica occidentale e centrale, distribuite nelle acque che si estendono dall'Australia al Giappone e dalla Micronesia all'India; sono inoltre presenti nel Mar Rosso (Kramp, 1961; Bayha & Graham, 2011). Gli studi effettuati in passato su queste due specie sono stati poco esaustivi, anche perchè spesso, nonostante Stiasny nel 1924 li avesse descritti come appartenenti a due generi distinti, questi esemplari continuavano spesso ad essere confusi l'uno con l'altro e quindi non è affidabile attingere alle fonti più datate per avere un quadro veritiero riguardo alla loro evoluzione adattativa ed ai loro spostamenti nel corso degli anni (Bayha & Graham, 2011). Si pensi, ad esempio, che nel 1961 Moreira, attribuì il nome di *Mastigias scintillae* (Moreira, 1961) ad una popolazione di meduse che stava analizzando lungo le coste del Brasile e che è poi scomparsa; ad oggi, secondo la teoria di Bolton & Graham (2004) si può affermare con relativa certezza che potesse trattarsi proprio di *Phyllorhiza punctata*, specie dotata di estrema capacità di adattamento in habitat diversi da quello originario e che nel corso degli anni ha invaso la maggior parte delle acque del globo ad eccezione di quelle artiche ed antartiche (Bolton & Graham, 2004). Recenti studi molecolari effettuati sui campioni di tessuto delle meduse analizzate da Bolton & Graham (2004) hanno appunto confermato che si trattasse di *P. punctata* (Bayha & Graham, 2011).

Secondo la teoria di Graham *et al.* 2003, la causa principale del passaggio dalle acque del Pacifico a quelle dell'Atlantico potrebbe essere stata l'apertura del canale di Panama. -Allo stesso modo, è subentrata nelle nostre acque, in particolare nel Mar Ionio (Abed-Navandi & Kikinger, 2007), attraverso il canale di Suez (2009).

Anche *Mastigias papua* si è spostata dalle acque native, seppure in modo ridotto rispetto a *P. punctata*: ad oggi la si può osservare, oltre che nelle acque indo-pacifiche e nel Mar Rosso, anche nell'Oceano Atlantico Sud-occidentale (WoRMS www.marinespecies.org).

Dal punto di vista morfologico *P. punctata* possiede una campana abbastanza ampia (il diametro può raggiungere i 60 cm) e relativamente appiattita, di colore marrone pallido e con numerose piccole macchie bianche luminose sulla superficie (Graham *et al.*, 2003; Perry & Larsen, 2004); le otto braccia orali sono fuse tra loro a livello della porzione prossimale (Graham *et al.*, 2003). Come altre meduse, vive in simbiosi con le zooxantelle, responsabili del suo colore tendente al marrone (Pitt *et al.*, 2005).

Mastigias papua (Lesson, 1830) possiede invece una campana, il cui diametro si aggira intorno ai 10 cm, che appare trasparente nell'animale giovane, per poi diventare verdognolo o marrone chiaro e ricoperto da macchie bianche nell'adulto; possiede otto braccia orali fuse all'estremità prossimale (WoRMS www.marinespecies.org).

1.3.7 Famiglia Rhizostomatidae

A questa famiglia appartengono tre generi, *Rhopilema* (Haeckel, 1880), *Nemophilema* (Kishinuye, 1992) e *Rhizostoma* (Cuvier, 1799), che comprendono tutte le principali specie di medusa considerate commestibili e regolarmente commercializzate in Cina, Giappone e Paesi del Sud-Est Asiatico (*paragrafo 3.1*). La maggior parte di esse vive infatti nelle acque indo-pacifiche, ma esistono anche specie distribuite in quelle atlantiche e mediterranee.

Rhopilema esculentum (Kishinuye, 1891), conosciuta anche come *Rhopilema asamushi* (Uchida, 1927) abita le acque giapponesi e cinesi, soprattutto a livello delle zone costiere e delle baie. In particolare, la maggior parte di questi esemplari è distribuita nel Mare Interno del Giappone, nella Baia di Suruga, e in quella di Karatsu, nel Mare Ariake, nel Mare Cinese Orientale (Omori & Kitamura, 2004) e nel Mar Giallo, soprattutto lungo le coste della penisola di Liaotung e della Corea (Gao *et al.*, 2002).

Si tratta di una medusa relativamente grande, di circa 70 cm di diametro; la campana è di aspetto liscio, spessa nella porzione centrale e abbastanza sottile ai margini, i quali presentano delle lobature rotondeggianti (Omori & Kitamura, 2004). Le otto braccia orali sono fuse a livello prossimale per un quarto della loro lunghezza mentre, nei tre quarti distali, sono separate; ognuna di esse termina con tre alette (due delle quali sono rivolte esternamente rispetto all'asse centrale e la terza internamente) con margini sottili e frastagliati da cui si dipartono delle proiezioni filamentose. *R. esculentum* si presenta generalmente nelle due varietà bianca e rossa (rosso-marrone), anche se alcuni riportano

l'esistenza di esemplari blu (Omori & Kitamura, 2004). Secondo le testimonianze dei pescatori locali, infatti, la maggior parte delle meduse catturate durante l'anno e soprattutto a inizio estate si presentano nei classici colori bianco e rosso, ma nei soli due mesi di Agosto e Settembre vi è una predominanza del colore blu (Omori & Kitamura, 2004).

Rhopilema hispidum (Vanhoffen, 1888) è distribuita soprattutto nel Mar Cinese Meridionale, nella zona di Hong Kong, nel Mare di Ariake (Omori & Kitamura, 2004), lungo le coste giapponesi meridionali (Uchida, 1954) e nelle acque del Sud-Est Asiatico, con concentrazioni maggiori nel Mare di Giava, lungo le coste dell'isola di Giacarta e nel Mar Rosso meridionale (Stiasny, 1939) e, più recentemente, nella zona della Birmania (Kitamura, 2003). Gli esemplari di *R. hispidum* misurano circa 70 cm di diametro da adulti; la campana non è liscia come quella di *R. esculentum*, ma completamente cosparsa di macchie rialzate, di aspetto simile a verruche: negli esemplari giovani sono piccole, incolori e rotondeggianti, mentre negli adulti sono più grandi, giallognole ed appuntite. I margini sono suddivisi in lobi di forma triangolare ed appuntita (nei giovani sono rotondeggianti). Le otto braccia orali sono fuse tra loro nella metà prossimale e libere in quella distale, dove ognuna di esse termina con tre alette la cui morfologia è uguale a quelle di *R. esculentum* (Omori & Kitamura, 2004).

Rhopilema verrilli (Fewkes, 1887) è una medusa dell'Oceano Atlantico occidentale (coste degli USA e del Canada) tipica in particolare del Golfo del Messico, dove è distribuita soprattutto lungo le coste della Florida nei mesi di Luglio-Novembre (WoRMS www.marinespecies.org). La campana, liscia e di colore bianco crema, con screziature marroni ai margini, è a forma di fungo (infatti è conosciuta come “*mushroom jellyfish*”) e misura circa 20 cm. La struttura delle braccia orali è identica a quella di *R. hispidum* (Omori & Kitamura, 2004).

Rhopilema nomadica (Galil, 1990), come le altre specie appartenenti al genere *Rhopilema* finora descritte, è una medusa originaria delle acque tropicali indo-pacifiche. Tuttavia, a partire dagli anni Settanta, attraverso il Canale di Suez, ha colonizzato le acque del Mar Mediterraneo, stabilendosi soprattutto nell'area sud-orientale, lungo le coste del Peloponneso, di Israele e, in modo particolare, della Turchia (Galil *et al.*, 1990). E' addirittura inserita nella lista delle “100 specie maggiormente invasive delle acque europee” redatta dal “*Delivering Alien Invasive Species Inventories for Europe*” (DAISIE) a causa della rapidità con cui è riuscita ad insediarsi nel Mar Mediterraneo (Deidun *et al.*, 2011) causando non pochi problemi all'ecosistema delle nostre acque, ai pescatori e ai bagnanti. Nella *Tabella 1.1* si riportano appunto le principali zone di distribuzione di *R. nomadica* degli ultimi anni.

Zona	Periodo	Fonti
Israele: Beit Yanai	Giugno, 1986	1990
Israele: Hashdod, Hahotrim, Haifa	Estate, 1989	1990
Libano, Siria	1991	Lotan et al., 1994
Turchia: Baia di Mersin	Agosto, 1995	Kideys & Gucu, 1995
Malta	Autunno, 2004	Deidun et al., 2011
Turchia: Finike	Agosto, 2006	Ozturk & Isinibilir, 2010
Grecia: Golfo Lakonikos	2006	Siokou-Frangou et al., 2006
Turchia: Kas	Dicembre, 2009	Ozturk & Isinibilir, 2010
Turchia: Baia di Antalya	Estate, 2009	Ozturk & Isinibilir, 2010
Turchia: Adana	Estate, 2009	Ozturk & Isinibilir, 2010
Turchia: Baia di Mersin	Estate 2009, Inverno 2010 e Gen-Feb-Mar 2011	Sakinan, 2011
Turchia: Porto di Marmaris	Giugno, 2011	Gulsahin & Tarkan, 2011

Tab.1.1: Avvistamenti di *Rhopilema nomadica* nelle acque mediterranee. (modificata da Gülşahin e Tarkan, 2011)

Rhopilema nomadica è molto simile a *Rhopilema hispidum* sotto il profilo morfologico; la differenza principale risiede nella presenza di “tubercoli rotondeggianti sulla campana di *R. nomadica* rispetto alle verruche coniche ed appuntite presenti su quella di *R. hispidum*” (Galil et al., 1990). E' una medusa di circa 30 cm di diametro, ma alcuni esemplari possono arrivare a misurare addirittura il doppio (Galil et al., 1990).

Nemopilema nomurai (Kishinouye, 1922), con i suoi 2 metri di diametro e gli oltre 200 kg di peso, è la più grande medusa asiatica (Omori & Kitamura, 2004). Inizialmente ritenuta come appartenente al genere *Stomolophus* (*Stomolophus nomurai*, Uchida 1936 e Kramp 1961) alla luce di studi morfologici/molecolari la specie è stata riclassificata come *Nemopilema* (Omori & Kitamura, 2004). Questa medusa abita le acque marginali dell'Oceano Pacifico Nord-occidentale, in particolare il Mar Giallo (coste della provincia dello Zhejiang (Hong et al., 1978), la parte settentrionale del Mar Cinese orientale (Gao et al., 2002) ed il Mare del Giappone (Omori & Kitamura, 2004). Nel corso di questo secolo si sono verificati, sempre più di frequente e con intensità crescente, fenomeni di fioriture annuali di questa specie, soprattutto nelle acque giapponesi (Uye, 2008). Se infatti per tutto il secolo scorso gli incrementi annuali di popolazione di *N. nomurai* erano stati sporadici e di bassa portata, se ne ricordano uno nel 1920 (Kishinouye, 1922), uno nel 1958

(Shimomura, 1959) ed uno nel 1995 (Yasuda, 2004), a partire dal 2002 hanno cominciato a verificarsi praticamente ogni anno, con un numero di esemplari altissimo. Si pensi, ad esempio, alla fioritura estiva del 2005, considerata la più imponente di tutti i tempi, con oltre 500 milioni di esemplari registrati intorno all'isola di Tsushima, nel Mare del Giappone (Uye, 2008). Le cause di tale fenomeno sono essenzialmente da ricondurre ai cambiamenti ambientali verificatisi negli ultimi anni, in particolare al riscaldamento delle acque, all'eutrofizzazione e all'eccessivo sfruttamento delle risorse ittiche locali (pesca eccessiva) con conseguente inevitabile alterazione dell'intero ecosistema marino (Uye, 2008). Il fatto che le fioriture si verifichino con maggiore intensità a livello delle acque giapponesi piuttosto che di quelle cinesi (peraltro habitat originario di *N. nomurai*) si spiega analizzando il ciclo biologico proprio di questa specie. Secondo gli studi effettuati da Uye, 2008, infatti, la strobilazione dei polipi (la fase polipoide può sopravvivere per diversi anni) con successiva liberazione delle efire avverrebbe nelle acque cinesi ad inizio estate (Aprile-Giugno): nel giro di soli 50 giorni, in presenza di temperature adeguate (circa 23°C) e in abbondanza di cibo, le giovani meduse liberamente natanti raggiungono un diametro di almeno 10 cm; successivamente vengono trasportate dalle correnti marine verso Nord, nello Stretto di Tsushima, attraverso il quale raggiungono il Mare del Giappone nei mesi di Luglio-Agosto. Rimangono in queste acque fino al mese di Ottobre aumentando enormemente le loro dimensioni: a Luglio la campana misura circa 50 cm di diametro, per poi superare il metro di lunghezza a fine estate, periodo durante il quale si verificano le fioriture maggiori. Ad Ottobre queste meduse giganti oltrepassano lo stretto di Sugaru e si dirigono verso le acque dell'Oceano Pacifico, dove si riproducono sessualmente e, nel periodo invernale, muoiono. La fase medusoide, a differenza di quella polipoide, dura meno di un anno (Uye, 2008). Da un punto di vista morfologico, *N. nomurai* possiede una campana ricoperta da numerose verruche granulari incolori, di dimensioni maggiori nella porzione centrale. I margini sono suddivisi in otto grandi lembi, a loro volta suddivisi in molteplici lembi più piccoli. Le otto braccia orali, a forma di J, sono fuse tra loro nel quarto prossimale e libere in quello distale. Le braccia libere terminano con tre alette la cui struttura è uguale a quella di *R. esculentum* (Omori & Kitamura, 2004).

Rhizostoma pulmo (Macri, 1778) è la medusa più comune delle acque mediterranee (Fuentes *et al.*, 2011). E' infatti presente nel Mar Adriatico, Nel Mar Ionio, nel Mar Tirreno, Nel Mar Ligure, nelle acque della Tunisia e nel Mar Nero (Mariottini & Pane, 2010). E' inoltre ampiamente presente nell'Oceano Atlantico Nord-Orientale, soprattutto lungo le coste irlandesi, del Regno Unito e della Francia e del Belgio (WoRMS www.marinespecies.org). Le principali fioriture invernali si verificano soprattutto nelle

acque settentrionali del Mar Adriatico e del Mar Ionio (sia lungo la costa che in mare aperto), mentre quelle tardo-primaverili (quando le temperature raggiungono i 25,5°C) interessano maggiormente le coste del Libano fino a metà Agosto (Mariottini & Pane, 2010). Se fino a poco tempo fa questa era, senza dubbio, la medusa più abbondante presente nei nostri mari, nell'ultimo decennio è stata costretta a ridurre l'estensione del suo habitat per lasciare il posto, soprattutto a livello delle acque orientali, a *Rhopilema nomadica*, che dal Mar Rosso ha invaso e colonizzato quest'area mediterranea nel giro di pochissimi anni (Herut & Galil, 2000).

La campana di *R. pulmo* può raggiungere i 60 cm di diametro, ha una forma emisferica ed è di colore bianco opaco (negli esemplari giovani tendono ad avere una colorazione più trasparente) con margini ondulati di colore blu-violaceo. Le otto braccia orali sono fuse a livello prossimale e separate nella porzione distale (Associazione Italiana Acquario Mediterraneo: AIAM www.aiamitalia.it).

Rhizostoma luteum (Quoy *et al.*, 1827) è una medusa presente lungo la costa occidentale dell'Africa, nelle acque che bagnano il Portogallo e a livello dello Stretto di Gibilterra (Prieto *et al.*, 2013). Fino alla prima metà del secolo scorso questa specie non è stata oggetto di molti studi; le prime fioriture riportate in letteratura risalgono al 1827 (allora veniva chiamata *Orithyia lutea*), nello Stretto di Gibilterra, cui hanno fatto seguito quelle degli anni '30 lungo le coste portoghesi e, nel ventennio successivo, quelle nelle acque dell'Angola e della Mauritania e quelle nel Golfo di Guinea (Prieto *et al.* 2013). Negli ultimi due anni le fioriture di questa medusa sono state invece studiate nel dettaglio, soprattutto a livello della costa atlantica del Marocco e delle acque a sud della penisola Iberica; le principali vengono riportate in *Tabella 1.2*.

Da un punto di vista morfologico *R. luteum* è simile a *R. pulmo*, con una campana che può arrivare a misurare fino a 60 cm. La differenza tra le due risiede invece nella forma delle braccia orali, che in *R. luteum* sono più lunghe e più robuste nella porzione prossimale, dove si fondono tra loro in uno spesso manubrio; la parte distale termina invece con lunghe appendici fusiformi (Prieto *et al.*, 2013).

1.3.8 Famiglia Stomolophidae

Appartiene a questa Famiglia il solo genere *Stomolophus*. *Stomolophus meleagris* (Agassiz, 1860), conosciuto anche come “*cannonball jellyfish*” (palla di cannone), è una delle meduse più abbondanti delle coste sud-orientali statunitensi (Griffin & Murphy, 2011). E' presente anche nelle acque pacifiche, dalle coste della California all'Ecuador ad Est, dal Mare del Giappone al Mar Cinese Meridionale ad ovest. Presenta una campana

emisferica di circa 25 cm di diametro i cui margini sono pigmentati di marrone, e braccia orali piuttosto corte rispetto alle altre specie di Rhizostomeae (Griffin & Murphy, 2011).

Zona	Data	Fonti
Agadir, Morocco	5 Giugno 2012	Prieto <i>et al.</i> , 2013
Donana National Park	12 Giugno 2012	Prieto <i>et al.</i> , 2013
Malaga	17 Giugno 2012	http://www.laopiniondemalaga.es/malaga/2012/06/19/lluvias-calor-alimento-medusas/513769.html
Marbella	17 Giugno 2012	http://www.laopiniondemalaga.es/malaga/2012/06/18/medusas-gigantes-costa-costa-malaga/513600.html
Algarrobo	17 Giugno 2012	http://www.laopiniondemalaga.es/malaga/2012/06/18/medusas-gigantes-costa-costa-malaga/513600.html
Valdelagrana, El Puerto de Santa Maria	18 Giugno 2012	Prieto <i>et al.</i> , 2013
Carchuna, Motril	19 Giugno 2012	http://www.abc.es/20120619/sociedad/abci-medusaplaya-granada-201206191220.html
El Bajondillo, Torremolinos	1 Luglio 2012	http://www.diariosur.es/v/20120701/malaga/aparec-emedusa-proporciones-gigantes-20120701.html
La Colonia	2 Luglio 2012	http://www.la-actualidad.com/articulo/07022012/unarara-especie-de-medusa-gigante-se-deja-ver-en-lascostas-de-aguilas/
El Portus, Murcia	9 Luglio 2012	Persone comuni
El Rompillo-Roquetas de Mar	11 Luglio 2012	http://www.albamar.net/?p=1269
Cortadura, Cadiz	24 Luglio 2013	Prieto <i>et al.</i> , 2013
Cortadura, Cadiz	29 Luglio 2013	Prieto <i>et al.</i> , 2013
Donana National Park	6 Febbraio 2013	Prieto <i>et al.</i> , 2013
Donana National Park	7 Febbraio 2013	Prieto <i>et al.</i> , 2013

Tab. 1.2: Principali fioriture *R.luteum* 2012-2013 (tabella modificata da: Prieto *et al.* 2013)

E' una medusa commestibile ed è pertanto sfruttata a scopo alimentare, soprattutto nel golfo del Messico, dove viene pescata e lavorata per poi essere commercializzata in Asia (Griffin & Murphy, 2011).

1.3.9 Famiglia Thysanostomatidae

L'unico genere appartenente a questa famiglia è *Thysanostoma* (Hale, 1999); sono meduse indo-pacifiche, la cui campana misura 9-12 cm di diametro e con braccia orali piuttosto lunghe rispetto al corpo (fino a 3 volte il diametro della campana); queste ultime sono fuse tra loro nella porzione prossimale, mentre distalmente sono separate e formano, a due a due, una caratteristica Y rovesciata (Hale, 1999).

1.3.10 Famiglia Versurigidae

Appartiene a questa famiglia il solo genere *Versurigia*. Queste meduse possiedono una campana appiattita, che misura da 6 a 20 cm (Hale, 1999).

1.4. ORDINE DELLE SEMAEOSTOMEAE

L'Ordine delle *Semaeostomeae* (Agassiz, 1862) è suddiviso in tre grandi famiglie, nelle quali sono inseriti 19 generi e almeno 56 specie. Gli esemplari appartenenti a quest'Ordine, diffusi in tutti i mari del mondo, possiedono generalmente un'ampia campana di forma discoidale, con margini frastagliati. La cavità gastrovascolare è suddivisa in numerosi canali che si estendono dallo stomaco centrale al margine della campana. Le braccia orali, che circondano la bocca in posizione centrale, sono quattro, e, a differenza delle *Rhizostomeae*, non sono presenti bocche accessorie a questo livello. La maggior parte delle specie possiede un numero variabile di tentacoli che si dipartono dal margine della campana. Un'altra particolarità propria di quest'Ordine risiede nel ciclo biologico; infatti, alcune specie, non possiedono la fase polipoide, ma dalla planula (liberata per riproduzione gamica) si sviluppa direttamente una giovane medusa liberamente natante (Hale, 1999).

1.4.1 Famiglia Pelagiidae

Gli esemplari appartenenti a questa famiglia possiedono generalmente una campana che misura dai 10 ai 40 cm di diametro, ai margini della quale si dipartono otto o più tentacoli individuali (Garron Hale, 1999). Questa famiglia è distribuita nelle acque di tutto il mondo, in modo particolare nelle acque temperate del Mediterraneo, in quelle africane e lungo le coste del Brasile, dove si concentra a livello di baie ed estuari. Il genere *Pelagia*, durante il suo ciclo biologico, bypassa la fase polipoide e si sviluppa direttamente dalla planula (Mariottini, Giacco & Pane, 2008). *Pelagia noctiluca* (Forsskal, 1775) è una piccola medusa pelagica dalla distribuzione molto ampia; generalmente risiede nelle zone tropicali, ma attraverso le correnti marine può essere trasportata in acque più fredde come quelle atlantiche e pacifiche settentrionali (Mariottini *et al.*, 2008). Di norma trascorre la sua vita nella porzione d'acqua che va dalla superficie ai 150 metri di profondità anche se durante il giorno, nelle zone a clima più caldo, la si può ritrovare tra i 300 ed i 500 metri al di sotto della superficie del mare, fino ad un massimo di 1400 metri (Franqueville, 1971). Le zone di maggiore concentrazione di questa specie sono le acque pacifiche, in particolare quelle vicino alla costa californiana, il Mare Cinese Orientale e Meridionale (Dong *et al.*, 2010) e le acque mediterranee (Mariottini *et al.* 2008). Nell'Oceano Atlantico è distribuita maggiormente, soprattutto in estate, lungo le coste francesi (Bedry *et al.*, 1998), inglesi (Russell, 1970) e, talvolta, tedesche (Van der Baan, 1967). Le fioriture di *P. noctiluca* hanno interessato anche le coste occidentali irlandesi e scozzesi, nell'anno 1988 (Minchin,

1996). Nel Mar Mediterraneo è possibile osservarle soprattutto lungo le coste della Tunisia e dell'Algeria nei mesi autunnali (Hamza, 1990) mentre, nel Mediterraneo orientale, le fioriture si verificano essenzialmente nei mesi estivi, lungo le coste della Grecia (Manfrin & Piccinetti, 1983), della Turchia (Bingel *et al.*, 1991) e di Israele (Galil *et al.*, 1990). Nel Mar Adriatico questa medusa ha comportato notevoli inconvenienti a bagnanti e pescatori nei primi anni Ottanta (1981-1984), soprattutto a livello delle coste croate (Benovic, 1984), e, seppure in misura ridotta, anche di quelle italiane. Nel Mar Tirreno e nel Mar Ligure il fenomeno è invece relativamente sporadico (Mariottini *et al.*, 2008).

Pelagia noctiluca si presenta con una campana emisferica, a forma di cupola, di diametro compreso tra 3 e 10 cm, che termina esternamente con 16 lembi marginali di forma rettangolare, dai quali si dipartono dei tentacoli molto lunghi e ricchi di nematocisti. Le braccia orali sono quattro e della lunghezza di circa 30 cm. Il colore della campana varia dal marrone al rosa violaceo, da cui il nome *mauve stinger* (Mariottini *et al.*, 2008) e sembra essere in relazione con l'età della medusa: 1) **diametro** 10 mm **colore** trasparente; 2) **diametro** 20 mm **colore** giallo ocra con margini più scuri; 3) **diametro** 30 mm **colore** rosa-violaceo (Mariottini *et al.*, 2008).

1.4.2 Famiglia Cyaneidae

La maggior parte delle specie di questa famiglia appartengono al genere *Cyanea* e sono esemplari distribuiti nei mari di tutto il mondo, anche se, a differenza delle *Pelagiidae*, vivono nelle acque più basse e non in mare aperto. Altra differenza rispetto alle *Pelagiidae* risiede nel ciclo biologico, che in questo caso è quello tipico della maggior parte degli Scyphozoa, con fase polipoide e medusoide. Inoltre, i tentacoli non si dipartono individualmente dal margine della campana ma a grappoli (Hale, 1999).

Cyanea capillata (Linnaeus, 1758), universalmente conosciuta come “*lion's mane jellyfish*” (medusa criniera di leone, poiché ne rievoca la forma), con la sua campana che può raggiungere i 2 metri e mezzo di diametro e ed i suoi lunghi tentacoli (Costello & Colin, 1995), è senza dubbio una delle meduse più grandi del mondo. Abita soprattutto le fredde acque artiche e la parte settentrionale dell'Oceano Atlantico e dell'Oceano Pacifico, ma la si può trovare (esemplari più piccoli, con campana di 30-50 cm) anche nei mari vicini all'Australia ed alla Nuova Zelanda (Dawson, 2005) lungo la costa orientale degli USA e del Canada e nel Golfo del Messico e lungo le coste del Regno Unito (WoRMS www.marinespecies.org). Ha una campana di forma discoidale, il cui spessore si riduce a livello dei margini, dai quali si dipartono oltre 150 tentacoli molto lunghi e affusolati, come capelli. Il colore varia dal giallognolo al rossiccio.

1.4.3 Famiglia Ulmaridae

Il genere più rappresentativo di questa famiglia è senza dubbio *Aurelia*, appartenente alla subfamiglia *Aureliinae*. Si tratta del genere più diffuso in tutte le acque del mondo, presente in tutti i mari e a tutte le latitudini. La campana misura in genere dai 50 ai 250 mm, ed è provvista di numerosi tentacoli (Hale, 1999). *Aurelia aurita* (Linnaeus, 1758) riesce a sopravvivere in un range di temperatura che va da 0°C a 36°C e ad una salinità di 3-36‰ (Arai, 1997; Martin, 1999): per tale motivo ed è presente in praticamente tutti i mari dell'emisfero boreale, dalle latitudini polari fino ai tropici. Risulta perciò comune negli oceani Atlantico e Pacifico, venendo a costituire una presenza familiare nelle acque anche costiere dell'America settentrionale (Burnett *et al.*, 1998), dell'Europa (Paesi Baltici) del Giappone, della Corea dell'India e dell'Australia (Mills, 2001) e, seppure in minor misura, anche del Mediterraneo e nel Mar Nero (Turk *et al.*, 2008; Dawson & Jacobs, 2001). Nelle acque cinesi le principali fioriture si sono verificate nel Mar Giallo e nel Mare di Bohai, intorno alla provincia di Liaodong (Dong *et al.*, 2010).

Questa medusa possiede una campana che può raggiungere i 40 cm di diametro circolare, trasparente e leggermente frastagliata ai margini, dai quali si dipartono inoltre i sottili e corti tentacoli (Henroth & Groendahl, 1985).

CAPITOLO 2

LA MEDUSA: DA PIATTO TRADIZIONALE A BUSINESS

La medusa costituisce un alimento molto antico che è ampiamente diffuso, consumato ed apprezzato nella cucina tradizionale asiatica. La culla di tale cultura culinaria è la Cina, dove la pesca della medusa per il consumo alimentare è praticata da oltre duemila anni: il filosofo cinese Zhang Hua (232-300 a.C.) ne descriveva l'impiego già ai tempi della dinastia Tsin (Wu, 1955).

Si tratta di un prodotto considerato una vera e propria tradizione, che va oltre la semplice pietanza. I cinesi conoscono diversi modi per cucinare la medusa, cotta o non cotta; in genere viene sminuzzata e condita con olio, salsa di soia, aceto e zucchero, oppure inserita in insalate miste. “*Un matrimonio, un banchetto formale, una festa, sono considerati incompleti senza che vi sia un’insalata di medusa*” (Li & Hsieh, 2004).

Il fatto che le meduse vengano consumate e sfruttate commercialmente in Cina da oltre un migliaio di anni è il motivo per il quale questo paese ne è diventato l’indiscusso primo produttore e trasformatore (Omori & Nakano, 2001).

Tuttavia, l’evoluzione dei mercati globali ha determinato un incremento della richiesta e del suo consumo dando vita ad un business da milioni di dollari in tutto il continente asiatico (You *et al.*, 2007) che si è esteso, di recente, anche ai paesi occidentali.

2.1 LE SPECIE COMMESTIBILI

La maggior parte delle meduse commestibili appartengono all’Ordine delle Rhizostomeae, ulteriormente suddiviso in dieci famiglie quali *Catostylidae* (Gegenbaur, 1857), *Cepheidae* (Agassiz, 1862), *Lychnorhizidae* (Haeckel 1880), *Lobonematidae* (Stiasny, 1921), *Mastigiidae* (Stiasny, 1921), *Rhizostomatidae* (Cuvier 1799), *Stomolophidae* (Haeckel 1880), *Cassiopeidae* (Agassiz, 1862), *Versurigidae* (Maas 1903) e *Thysanostomatidae* (Haeckel 1880). ma stando alle fonti bibliografiche, le specie maggiormente utilizzate fanno capo principalmente a 5 (Tab 2.1).

Tra queste, le specie maggiormente consumate in Asia sono essenzialmente tre, ed appartengono alla Famiglia delle **Rhizostomatidae**. Si tratta di *Rhopilema esculentum*, *Rhopilema hispidum* e *Nemopilema nomurai*, conosciute in Giappone rispettivamente come “*Bizen kurage*”, “*Hizen kurage*” e “*Echizen Kurage*” (“kurage” significa “medusa” in giapponese), in riferimento agli antichi nomi delle provincie in cui furono rinvenute per la prima volta (Omori & Kitamura, 2004).

FAMIGLIA	SPECIE COMMERCIALMENTE APPREZZATE
Catostylidae	<i>Catostylus mosaicus</i> (Quoy & Gaimard, 1824) <i>Crambione mastigophora</i> (Maas, 1903) <i>Crambionella orsini</i> (Vanhöffen, 1888)
Cepheidae	<i>Cephea cephea</i> (Forskål, 1775)
Lobonematidae	<i>Lobonema smithii</i> (Mayer, 1910) <i>Lobonemoides gracilis</i> (Light, 1914)
Rhizostomatidae	<i>Rhizostoma pulmo</i> (Macri, 1778) <i>Rhopilema esculentum</i> (Kishinouye, 1891) <i>Rhopilema hispidum</i> (Vanhöffen, 1888) <i>Nemopilema nomurai</i> (Kishinouye, 1922) <i>Rhopilema nomadica</i> (Galil, Spanier & Ferguson, 1990)
Stomolophidae	<i>Stomolophus meleagris</i> (L. Agassiz, 1862)

Tab 2.1: specie maggiormente utilizzate per la preparazione di alimenti a base di medusa

Rhopilema esculentum, che può raggiungere un diametro di ca. 70 cm e un peso umido di 30 kg, è la specie più abbondantemente presente nelle acque asiatiche (Mar del Giappone, Mar Giallo, Mar Cinese Orientale) ed è senz'altro la più sfruttata e consumata in Cina, Corea e Giappone (You *et al.*, 2007), nonché quella dal prezzo di mercato più alto (Omori & Nakano, 2001). ***Nemopilema nomurai*** è originaria delle acque cinesi, ma raggiunge il Mar del Giappone in estate e in autunno; può raggiungere un diametro di 2 m e un peso umido di ca. 200 kg (Kawahara *et al.*, 2006). ***Rhopilema hispidum*** è ampiamente diffusa in tutta la zona indo-pacifica, dalle coste giapponesi, a quelle cinesi, alle acque delle Filippine, della Malesia e dell'Indonesia, così come nell'Oceano Indiano, fino al Mar Rosso (Omori & Nakano, 2001) ed è pescata in modo particolare in Vietnam (Nishikawa *et al.*, 2008).

Rhizostoma pulmo è invece una medusa del Mar Mediterraneo, del Mar Nero e del Mare del Nord; non viene consumata nei paesi autoctoni anche se sembra che un'esigua quantità di esemplari appartenenti a questa specie vengano pescati a scopo commerciale nel Mar Nero e nel Mar di Marmara, lungo le coste turche.

Lobonema smithii e ***Lobonemoides gracilis*** sono distribuiti quasi esclusivamente nelle acque tropicali indo-pacifiche (Omori & Nakano, 2001), così come ***Cephea cephea***, che tuttavia si può ritrovare anche nel Mar Rosso (Omori & Nakano, 2001) e nelle acque tropicali dell'Oceano Atlantico (WoRMS).

Crambione mastigophora, ***Crambionella orsini*** e ***Catostylus mosaicus***, sono specie aggiunte abbastanza di recente alla lista delle meduse commestibili; ***Crambione mastigophora*** viene pescata soprattutto nelle acque della penisola malese e dell'isola di Java, mentre ***Crambionella orsini*** è distribuita maggiormente nel Golfo del Bengala, oltre

che nel Golfo iraniano e nel Mar Rosso (Omori & Nakano, 2001). La medusa *Catostylus mosaicus* si trova invece nelle acque delle Filippine, della Nuova Guinea e, soprattutto, lungo le coste dell'Australia, in particolare nel Nuovo Galles del Sud (Pitt & Kingsford, 2000), dove viene pescata, trasformata e rivenduta in Cina, Giappone e paesi del Sud-Est Asiatico come prodotto alimentare (Omori & Nakano, 2001). Gli imponenti banchi di meduse appartenenti a questa specie che ogni anno affiorano in superficie nelle acque australiane hanno dato recentemente avvio alla pesca e allo sfruttamento di *C. mosaicus* a scopo alimentare, soprattutto nella zona del Nuovo Galles del Sud (Pitt & Kingsford, 2000). La finalità non è l'autoconsumo, in quanto in Australia non viene considerata un prodotto gastronomico, bensì l'esportazione verso i mercati asiatici (Poole *et al.*, 2002).

Al forte aumento delle richieste da parte dei mercati asiatici è conseguita una altrettanto ingente riduzione degli *stock* delle meduse locali. Per far fronte a tale fenomeno, i paesi consumatori hanno quindi, negli ultimi anni, cominciato a considerare anche l'importazione dall'estero. I vantaggi di questa nuova politica economica sono stati non solo a carico dei paesi importatori, ma anche e soprattutto di quelli esportatori, grazie al nuovo sfruttamento di una enorme risorsa ittica fino ad allora inutilizzata (Poole *et al.*, 2002). Tra i paesi che si sono affacciati sul mercato, oltre all'Australia, con lo sfruttamento di *Catostylus mosaicus*, si sono recentemente aggiunti anche gli Stati Uniti, che hanno cominciato a sfruttare le meduse appartenenti alla specie *Stomolophus meleagris*, abbondantemente presente nel Golfo del Messico (Hsieh & Rudloe, 1994). Sebbene a livello globale, infatti, non vi sia una regolamentazione che disciplini la pesca e la trasformazione di questi prodotti, alcuni Stati degli USA sono già indirizzati da tempo verso questa nuova attività. In Florida, ad esempio, esistono dal 1992 aziende che si occupano della produzione di generi alimentari a base di medusa (Rudloe, 1992), mentre in Georgia viene regolarmente praticata la pesca esclusiva di questi animali con particolari reti a strascico (Griffin & Murphy, 2011).

Anche in Argentina la pesca delle meduse e le relative tecniche di lavorazione sono allo studio sulla medusa locale, la *Lychnorhiza lucerna*, ampiamente distribuita nell'estuario del Rio de la Plata e nelle acque limitrofe (Schiariti *et al.*, 2008). Le fioriture di questa specie comportavano ogni anno notevoli perdite economiche ai pescatori locali, ingolfando le reti e riducendo il pescato (Schiariti, 2008); per ridurre questo problema i pescatori hanno cominciato a valutare la possibilità di sfruttare questa specie autoctona a scopi commerciali (Mianzan *et al.*, 2005), anche perché, appartenendo all'Ordine delle Rhizostomeae, essa sembrerebbe possedere tutte quelle caratteristiche tipiche delle specie commestibili regolarmente commercializzate (Schiariti *et al.*, 2008). In Canada, invece, è

stata studiata la possibilità di sfruttare la specie *Aurelia aurita*, appartenente all'ordine delle *Semaeostomeae*, che viene pescata nelle aree di Trinity Bay e British Columbia. Tuttavia, la valutazione qualitativa del prodotto ottenuto con questa specie, effettuata in Cina, Taiwan e Florida nel 2008, ha messo in evidenza la necessità di ulteriori ricerche per trovare le condizioni ottimali di lavorazione; inoltre, sembra che il mercato asiatico prediliga meduse più grandi rispetto ad *A. aurita* (Sloan & Gunn, 1985).

Ad oggi l'identificazione su base morfologica della medusa è particolarmente complicata anche in presenza di esemplari freschi e ben conservati, in relazione alla presenza di specie criptiche. Per ovviare tale problema i commercianti hanno così catalogato i prodotti presenti sul mercato sulla base di peculiari caratteristiche quali la forma, le dimensioni, la consistenza ed il colore, raggruppandoli in 8 tipologie principali (Omori & Nakano, 2001). In particolare si riconoscono:

1. **Tipo Rosso/Tipo cinese:** meduse leggermente rossastre, con campana liscia di 300-600 mm di diametro; si tratta con ogni probabilità di *Rhopilema esculentum*.
2. **Tipo Bianco:** meduse biancastre la cui campana, di 500 mm di diametro, presenta numerose escrescenze puntiformi di circa 1-2 cm. Vengono pescate in mare aperto, lontano dalla costa; tipologia attribuibile a *Lobonema smithii*.
3. **Tipo Sabbia:** meduse con campana biancastra dotata di numerose escrescenze e macchie marroni con diametro che può raggiungere i 500 mm. Vengono pescate sia a largo che vicino alla costa; si tratta probabilmente di *Rhopilema hispidum*.
4. **Tipo di Fiume:** meduse biancastre o brunastre, con campana ruvida di circa 200 mm di diametro; le si pesca in acque salmastre vicino alle foci dei fiumi.
5. **Tipo di Cilacap:** meduse dal caratteristico colore lilla, con campana che raggiunge i 250 mm di diametro provvista di fini scanalature; prendono il nome dall'area geografica in cui vivono, nelle acque di Cilicap, Giava orientale.
6. **Tipo Prigi:** meduse color amaranto e diametro notevole (400 mm). Si trovano in abbondanza presso la Baia di Prigi e Muncar, Java orientale; potrebbe trattarsi di *Crambione mastigiphora*.
7. **Tipo Semi-cinese:** meduse simili al Tipo Rosso ma più piccole (150 mm di diametro).
8. **Tipo a Sfera:** meduse brunastre, con campana spessa e rigida provvista di creste marginali e scanalature caratteristiche; tipologia riferibile a *Crambionella orsini*.

In generale, mentre dei tipi cinesi e semi-cinesi vengono commercializzate sia la campana che le braccia orali, per quanto riguarda i tipi bianchi e di sabbia, ci si limita all'utilizzo della sola campana (Omori & Nakano, 2001).

2.2 PRODUZIONE E CONSUMO DI MEDUSA A LIVELLO MONDIALE

Gran parte dei cinesi all'estero, praticamente il 75% vivono nei paesi del Sud-Est asiatico, in particolare nella penisola indocinese e negli arcipelaghi dell'Indonesia, Borneo e Filippine. Sono state queste aree, infatti, la prima meta del flusso migratorio cinese verso l'estero, fenomeno che è iniziato intorno al XVII secolo, ma è che divenuto particolarmente rilevante nel XIX secolo (Campani *et al.* 1994) (vedi *Paragrafo 2.1*). Con il tempo, le comunità di immigrati cinesi introdussero negli altri paesi, fra le tante tradizioni proprie della madrepatria, anche la cultura alimentare della medusa, con le relative tecniche di pesca e lavorazione (Omori & Nakano, 2001). Tuttavia, tale risorsa ittica non fu presa in considerazione fino alla fine della prima metà del XIX secolo, e lo dimostra il fatto che fino ad allora il Giappone, paese leader nel consumo di medusa, importava il prodotto esclusivamente dalla Cina (Omori & Nakano, 2001). A partire dagli anni Settanta però, a causa della riduzione degli stock delle meduse cinesi con conseguente aumento del prezzo di mercato del prodotto, i commercianti giapponesi cominciarono ad acquistare le meduse dai paesi del Sud-Est asiatico; da allora, la medusa cominciò dunque ad essere ampiamente sfruttata in paesi quali Filippine, Vietnam, Thailandia, Malesia, Indonesia e Birmania (Omori & Nakano, 2001). Il vero e proprio boom di produzioni si è verificato negli anni Novanta; secondo i documenti del *Tokyo Customs House*, infatti, la quantità di meduse importate ogni anno in Giappone dal Sud-Est asiatico è quasi raddoppiata nel giro di un decennio, dalle 5369 tonnellate nel 1988 alle 10.084 tonnellate nel 1999 (Omori & Nakano, 2001). Il valore commerciale di tali prodotti è passato da 1479 a 4113 milioni di yen ogni anno (con una media di 2733 milioni di yen, che equivalgono a circa 25,5 milioni di dollari USA). Per capire l'importanza che ha rivestito questo nuovo settore nei paesi del Sud-Est asiatico si pensi che, nello stesso decennio, il Giappone ha importato in media dalla Cina solo 2933 tonnellate annuali.

Si deve comunque considerare che le catture effettive sono di fatto superiori a quelle esportate, anche perché, in questi paesi la medusa viene regolarmente consumata. Secondo stime attendibili infatti, la quantità di animali pescata sarebbe almeno 1,5 volte maggiore rispetto ai dati giapponesi sulle importazioni (Omori & Nakano, 2001). I dati statistici forniti dal Governo vietnamita, ad esempio, indicano che le esportazioni, nel periodo che va dal 1995 al 2005 sono passate da un totale di 1500 tonnellate a 4600 tonnellate per anno. Nello stesso studio si calcola che il numero di esemplari catturati durante ogni stagione di pesca in Vietnam si aggiri tra 800.000 e 1.200.000 (Nishikawa *et al.*, 2008).

Secondo le statistiche della FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) la quantità media di catture in tutto il Sud-Est asiatico nel periodo che va dal 1988 al 1997 si aggirerebbe intorno alle 85.697 tonnellate (peso fresco) (FAO, 1999), dato quest'ultimo potenzialmente sottostimato a causa della scarsa importanza attribuita a livello internazionale alla pesca di tali organismi e che secondo quanto riportato da Omori e Nakano nel 2001 potrebbe raggiungere le 169000 tonnellate totali. I dati prodotti dallo studio di Omori e Nakano (2001) coincidono invece con quelli della FAO riguardo alle catture in Cina, che, nello stesso periodo (1988-1997), sarebbero di circa 152.382 tonnellate (FAO, 1999; Omori & Nakano, 2001).

Paese	Zone di pesca	Tipo	Stagione di pesca
Filippine	San Miguel Bay (Luzon)	Bianco	Feb-Mag
	Carigara Bay (Samar and Leyte)	Bianco	Feb-Mag
	Malampaya Sound and Port Barton (palawan)	Bianco	Apr-Mag
Vietnam	Haiphon and Tongking Bay	Sabbia	Lug-Set
	Cam Ranh (South China Sea)	Bianco	Feb-Apr & Lug-Ott
	Phu Quoc Island (Gulf of Thailand)	Bianco	Ott-Mar
Thailandia	Rayong and Samut Sakhon (Gulf of Thailand)	Bianco & Sab.	Mag-Lug
	Ranong (Andaman Sea)	Bianco	Dic-Mar
Malesia	Matu (Sarawak)	Rosso	Feb-Apr & Ago-Dic
	Kahong, Kuching & Sematan (South China Sea)	Bianco	Mar-Ott
	Ioph and Luala Lumpur (Strait of Malacca)	Bianco, Rosso & Fiume	Lug-Set
	Penang, Pangkor and Telok Anson (Strait of Malacca)	Semi-Cina	Lug-Set
Indonesia	Bacan Island (Halmahera)	Semi-Cina	Lug-Ago
	Balikpapan & Kotabalu (East Kalimantan, Makassar Strait)	Bianco	Ago-Nov
	Tuban (East Java, Java Sea)	Bianco & Sab.	Mar-Mag & Set-Nov
	Cirebon (West Java, Indian Ocean)	Sabbia	Ago-Nov
	Muncar & Prigi (West Java, Indian Ocean)	Prigi	Lug-Nov
	Cilacap (West Java, Indian Ocean)	Cilacap	Ago-Nov
	Bangka Island (South Sumatra, Java Sea)	Bianco	Mag-Nov
	Tanjung Balai and southern coasts (Strait of Malacca)	Fiume	Mag-Ago
	Medan (North Sumatra)	Bianco	Giu-Dic
Birmania	Sittwe (Arakan, Bay of Bengal)	Bianco & Sfera	Mar-Mag & Giu-Set

Tab.2.2: Principali zone/stagioni di pesca dei diversi tipi di medusa in Sud-Est Asiatico (Omori & Nakano, 2001)

Questa cifra lascia chiaramente intuire che gran parte delle meduse pescate in Cina vengono destinate al mercato interno, piuttosto che all'esportazione, nella quale hanno assunto un ruolo predominante i paesi del Sud-Est Asiatico.

Stabilire con esattezza la quantità di meduse catturate a livello mondiale risulta oggi alquanto complesso (Brotz, 2011). Secondo le statistiche FAO si aggirerebbe intorno alle

centinaia di migliaia di tonnellate ogni anno, ma queste cifre sono assolutamente sottostimate, in relazione anche al fatto che si riferiscono esclusivamente al genere “*Rhopilema*”, mentre è ormai noto che gli esemplari commestibili appartengono non solo ad altri generi (*Rhizostoma*, *Nemopilema*), ma addirittura ad altre famiglie (*Cepheidae*, *Catostylidae*, *Lobonematidae*, *Lychnorizidae*, *Stomolophidae*) e non si esclude la commercializzazione di esemplari che non appartengono neanche allo stesso Ordine delle Rhizostomeae (si pensi, ad esempio, ai generi *Aurelia* e *Cyanea*) (Brotz, 2011).

Come precedentemente anticipato la pesca della medusa viene praticata anche in altri paesi, quali l’India, la Turchia e, più di recente, l’Australia, l’Argentina, la Namibia, la Russia, il Nicaragua, il Messico e gli USA (Brotz, 2011; Li & Hsieh, 2004). Nei paesi occidentali (soprattutto negli USA ed in Argentina) questa esigenza è nata essenzialmente per far fronte agli inconvenienti alla pesca locale determinati dalla presenza di abbondanti fioriture di specie autoctone. In questo contesto, alcuni pescatori hanno cominciato a praticare un’attività di pesca e lavorazione specifica nei confronti della medusa locale, per poi esportarla in Asia come prodotto lavorato (Schiariti *et al.*, 2008). La stessa FAO ha proposto lo sviluppo di prodotti alimentari a base di meduse per limitarne la proliferazione e far fronte alla minaccia che questi animali rappresentano per gli altri comparti ittici (<http://www.fao.org/docrep/017/i3169e/i3169e.pdf>). C’è tuttavia da precisare che, seppure la grande maggioranza degli esemplari catturati in questi paesi siano destinati ad essere esportati, un’esigua parte di essi resta nel mercato interno; negli ultimi anni, infatti, seppure in modo ancora molto ridotto, alcuni paesi dell’occidente hanno incominciato ad apprezzare questo nuovo prodotto, in relazione alle sue particolari proprietà nutrizionali, che lo rendono un alimento a bassissimo tenore calorico (Castigliego *et al.* 2009) e quindi particolarmente adatto alle esigenze dei consumatori in cerca di pietanze “*light*”. Inoltre, gli antichi trattati di medicina cinese ne riportano le notevoli proprietà terapeutiche, confermate anche da studi moderni (vedi *Paragrafo 3.3*). La medusa, in sostanza, rientrerebbe appieno nel trend commerciale del mercato alimentare moderno, sempre più indirizzato verso prodotti etnici e salutistici. La gastronomia “etnica” si è infatti delineata come vera e propria moda alimentare, sia in termini di distribuzione che di ristorazione, dando vita ad un vero e proprio business nel mondo occidentale (Armani *et al.* 2011b).

2.2.1 Tra tradizione e nuove tendenze: la pesca e l’acquacoltura

La pesca tradizionale della medusa, in Cina così come nei paesi del Sud-Est asiatico, viene praticata essenzialmente nei mesi che vanno da Marzo a Maggio e da Agosto a Novembre con una percentuale di raccolta così distribuita: il 35% in agosto, il 26% in aprile ed il 18% in ottobre (Omori & Kitamura, 2004). Le condizioni atmosferiche e le maree, infatti,

hanno un ruolo determinante in questo settore, poiché le meduse tendono ad affiorare in superficie solo se il mare è calmo. Nel periodo che va da Dicembre a Febbraio, in cui il clima è secco e prevalgono i venti nord-orientali e nord-occidentali che rendono il mare mosso, la pesca non viene praticata (Omori & Nakano, 2001); a tal proposito si può ragionevolmente affermare che la produttività e la resa economica subiscono variazioni notevoli nell'ambito delle stagioni dell'anno. Queste variazioni si traducono in un'instabilità finanziaria degli operatori del settore che si trovano costantemente a misurarsi con le modificazioni inter-annuali della presenza di meduse (Nishikawa *et al.*, 2008). In generale non vi sono sostanziali differenze tra le metodologie di pesca applicate nei diversi paesi (Omori & Nakano, 2001); questa viene effettuata solo nelle ore diurne, con semplici barche a motore costruite con il bamboo, a bordo delle quali lavorano solitamente 3-4 pescatori (Nishikawa *et al.*, 2008).

Possono essere utilizzati vari tipi di reti da pesca: in particolare si ricorre a reti da traino (di quelle che si usano per pesci o gamberetti) di circa 9-10 metri di altezza per 90-100 metri di larghezza con maglie quadrate di lato 10 cm (Nishikawa *et al.*, 2008) e reti fisse provviste di imboccatura rettangolare posizionate verticalmente in direzione contraria alla corrente marina (Kitamura & Omori 2010) che vengono lasciate in mare in modo che siano le prede a raggiungerle ed a rimanervi impigliate.

In alcune zone resta ancora praticata una pesca ancora più tradizionale, previa uso di particolari ganci in legno e bamboo con i quali le meduse vengono arpionate in superficie (Kitamura & Omori, 2010).



Fig. 2.1: Pesca di *Rhopilema hispidum* lungo le coste di Thanh Hoa, Vietnam; **a)** un peschereccio recupera una rete; **b)** peschereccio pieno di meduse. (immagini tratte da: Nishikawa *et al.*, 2008)

Il rapido incremento delle richieste di mercato ha senz'altro messo in evidenza l'effettivo problema dell'arretratezza e dell'instabilità della pesca tradizionale ed ha scaturito l'esigenza di mettere in atto tecniche di riproduzione artificiale della medusa, con l'obiettivo di promuoverne lo sviluppo commerciale, attraverso la stabilizzazione e

l'incremento delle catture (lo scopo è infatti quello di crescere e allevare, in tempi brevi, abbondanti quantitativi di meduse) (You *et al.*, 2007).

In alcune aree della Cina l'acquacoltura ha addirittura soppiantato i sistemi di pesca tradizionale: solo nella provincia di Liaoning vengono destinati a questa attività oltre 8000 ettari di superficie, destinati all'allevamento di oltre 500 milioni di esemplari (Guan *et al.*, 2004). L'allevamento può essere condotto secondo un sistema a ciclo "aperto" o a ciclo "chiuso". Nel sistema a ciclo aperto le giovani meduse vengono allevate in vasche fino a quando la campana non ha raggiunto un diametro compreso tra i 10 ed i 50 mm, per poi essere rilasciate in mare aperto ad incrementare la popolazione naturale (You *et al.* 2007). In questo tipo di allevamento al momento del rilascio è opportuno valutare attentamente alcuni fattori ambientali come la temperatura marina e l'ambiente (baia o lungo la costa), che incidono notevolmente sul tasso di mortalità delle meduse e ne influenzano la percentuale di ricattura, variabile dallo 0.8 al 3.3% (You *et al.*, 2007).

Nel sistema a ciclo chiuso le meduse sono allevate fino alla taglia commerciale all'interno di reti chiuse lungo zone costiere o all'interno di stagni artificiali con acqua di mare. Prima del loro inserimento può essere necessario l'utilizzo di disinfettanti per eliminare eventuali predatori, promuovere la fioritura del plancton e garantire alle meduse un approvvigionamento alimentare naturale, spesso integrato con plancton d'allevamento o di cattura. Un approvvigionamento di cibo sufficiente garantisce il raggiungimento della taglia commerciale (campana ≥ 30 cm) in 70 giorni (Xie *et al.*, 2004).

2.3. PREPARAZIONE DEI PRODOTTI A BASE DI MEDUSA

Il trattamento tradizionale è un processo dai bassi costi ma che richiede una lunga lavorazione in termini di tempo e manodopera (Hsieh *et al.*, 2001). Una volta pescate, le meduse vengono immediatamente processate sulla spiaggia poiché, in relazione al loro rapido deperimento a temperatura ambiente, la loro trasformazione deve iniziare quando l'animale è ancora vivo (Hsieh *et al.*, 1996). Gli addetti alla lavorazione, in genere le mogli ed i figli dei pescatori (Nishikawa *et al.*, 2008), provvedono a lavarle con acqua di mare, separare le braccia orali dalla campana e raschiare quest'ultima per eliminare il muco superficiale, il materiale gonadico e l'intero contenuto gastrovascolare (Li & Hsieh, 2004). Le parti commestibili sono rappresentate dalla campana, dalle braccia orali, e dal c.d. "fusto", ossia la porzione prossimale delle braccia orali, fuse tra loro in un unico pezzo. Queste tre distinte regioni vengono inviate alle industrie competenti che le processano separatamente e con trattamenti leggermente diversi tra loro (Nishikawa *et al.*, 2008), fermo restando che, indipendentemente dalla parte lavorata, vi sia di base l'utilizzo di una

miscela di sale (NaCl) e allume ($\text{Al}_2[\text{SO}_4]_3 \cdot 14\text{H}_2\text{O}$). Infatti, il sale ha lo scopo di ridurre il tenore di acqua e mantenere il prodotto microbiologicamente stabile, mentre l'allume serve ad abbassare il pH (da 6,6 a 4,5-4,8) ed a rassodare il tessuto facendo precipitare le proteine (Li & Hsieh, 2004). Impiegando sale ed allume singolarmente, non si otterrebbe un prodotto finale qualitativamente soddisfacente (Hsieh & Rudloe, 1994).

Nel dettaglio, le campane vengono poste in vasche contenenti le soluzioni di sale (20-30%) ed allume (5-10%), e miscelate ad intervalli di 6 ore fino al giorno successivo, in cui le si toglie dalla salamoia per ispezionarle e lavorarle nel dettaglio: vengono rimossi i residui epidermici sfuggiti alla precedente grossolana lavorazione in spiaggia e tagliate via le parti marginali più dure. In seguito vengono impilate con del sale inserito tra una campana e l'altra e poste nuovamente in una miscela a base di sale ed allume nella quale la concentrazione del sale viene incrementata fino al 70%. Qui vengono lasciate per un periodo che va da una settimana ad un mese e mezzo (a seconda delle richieste di mercato). Le braccia orali non vengono messe da subito in salamoia come le campane, bensì centrifugate per almeno 4 ore in ampie vasche contenenti acqua fresca e priva di sali, al fine di rimuovere il muco e le nematocisti (contenenti gli organelli urticanti). Successivamente anche queste vengono trasferite nella miscela tradizionale, a concentrazioni iniziali leggermente maggiori (allume 15%; sale 50%), dove rimangono per circa 5 giorni durante i quali le concentrazioni della soluzione vengono aumentate ad intervalli di 5 ore fino al raggiungimento finale del 20% di allume e del 70% di sale.

La lavorazione del fusto è notevolmente più semplice rispetto a quella della campana e delle braccia orali; esso viene immediatamente immerso nella miscela suddetta (allume 15%; sale 50%) e ivi mantenuto per un periodo che va da 5 giorni ad un mese e mezzo, senza l'ulteriore aggiunta di sali alla concentrazione iniziale (Nishikawa *et al.*, 2008). Sulla base di quanto detto è evidente che il processo più articolato in termini di tempi e tecniche di lavorazione riguarda la campana, motivo per il quale questa viene venduta a prezzi più alti (Omori & Nakano, 2001). Nonostante questo la domanda del mercato giapponese è selettivamente e quasi esclusivamente rivolta a questa parte, mentre in Cina si è verificato un incremento del consumo delle braccia orali (Kitamura & Omori, 2010), dalle quali si ottiene (a costi inferiori) un prodotto finale essenzialmente identico (Nishikawa *et al.*, 2008), con il 60-70% di umidità e il 16-25% di sale. La resa finale varia dal 7 al 10% (Li & Hsieh 2004).



Fig.2.2: Lavorazione di *Rhopilema hispidum* a Thanh Hoa, Vietnam; **a)** prima processazione delle meduse in spiaggia; **b)** raschiamento della campana con un bastone di bamboo; **c)** vasca di centrifugazione delle braccia orali; **d)** braccio orale parzialmente lavorato; **e)** vasca con campane impilate; **f)** casse di legno per imballaggio dei prodotti. (Immagini tratte da Nishikawa, 2008)

Un prodotto finito deve essere in grado di rispondere alle richieste di mercato soddisfacendo le caratteristiche identificative di qualità espresse in tabella 2.3. Le componenti trattate, vengono poi sminuzzate e commercializzate come prodotti in salamoia in appositi contenitori e possiedono una *shelf-life* notevolmente lunga, che varia da un anno a temperatura ambiente a due anni se mantenuti a temperatura di refrigerazione (Omori & Nakano, 2001). Al momento della consumazione è opportuno tuttavia desalare e reidratare il prodotto in acqua per almeno 60 minuti (Li & Hsieh, 2004).

Caratteristica	Requisiti di mercato per un prodotto di qualità
Elasticità	Il prodotto finito deve essere elastico, resistere ad un leggero stiramento senza rompersi per poi ritornare alla forma originale.
Tessitura	E' la caratteristica più difficile da ottenere. Le meduse devono essere il più possibile croccanti, ma senza perdere l'elasticità, presentando un equilibrio perfetto tra queste due caratteristiche.
Colore	Le tonalità chiare sono preferite; le rosse o quelle dorate sono comunque apprezzate.
Dimensione	La dimensione è la caratteristica fondamentale per il prezzo del prodotto. Le meduse asiatiche, a seguito del trattamento, presentano una lunghezza di diametro compresa tra i 30 e i 50 cm.

Tab. 2.3: Caratteristiche indicative di qualità della medusa processata (Schiariti, 2008).



Fig.2.3 :a) Prodotto in salamoia (PC) acquistato a Prato in data 25/02/2013 con relativa etichetta (b)

La medusa viene inoltre venduta in forma di prodotto già desalato e reidratato “*Ready to eat*” di consistenza croccante, in genere provvisto di particolari salse di accompagnamento (salsa di soia, wasabi o mostarda) e confezionato con il materiale Polietilene/Poliestere Laminato (PET/LDPE), che ne conserva il colore, la freschezza, l’aroma e il sapore (Poole *et al.*, 2002). L’esigenza di commercializzare prodotti direttamente pronti al consumo è recente, e si abbina meglio a quelle che sono le abitudini alimentari della società moderna, il cui stile di vita impone preparazione di piatti veloci; in tale contesto, il lungo tempo di desalatura necessario per i prodotti in salamoia non troverebbe ampio riscontro nei consumatori (Li & Hsieh , 2004).

La preparazione dei prodotti *Ready to eat* si articola nelle seguenti fasi:

1. Le meduse, preconfezionate secondo il metodo classico dopo l’iniziale desalatura per immersione in acqua fresca per 24 ore sono sottoposte a lavaggi seriali con acido acetico diluito serialmente;
2. A termine delle procedura di lavaggio, le meduse vengono brevemente riscaldate a 60°C e successivamente raffreddate a temperatura ambiente;
3. Segue quindi una fase di condizionamento del prodotto con una miscela a base di sale, zucchero, glutammato monosodico ed altre sostanze in grado di legare le molecole di acqua;

4. Trascorse 1-2 ore, dopo l'allontanamento della soluzione si procede alla fase di asciugatura e l'aggiunta eventuale di condimento;
5. Il prodotto ottenuto viene sterilizzato con raggi UV e confezionato sottovuoto
6. Una volta sterilizzato, il prodotto è pronto per essere confezionato (sottovuoto).

La metodologia di preparazione dei prodotti *Ready to eat* è stata oggetto di numerosi studi, la maggior parte dei quali nati dall'esigenza di ridurre al minimo la carica microbica finale e, di conseguenza, migliorarne notevolmente la *shelf-life*. Qiu Kuan *et al.* (1995) hanno sviluppato un metodo di sterilizzazione alternativo a quello UV, utilizzando una miscela a base di sale, acido acetico e alcool, in cui immergere i prodotti per dieci minuti al massimo; questo metodo sembrerebbe garantire un prodotto microbiologicamente sicuro per almeno 90 giorni. Potrebbe inoltre rivelarsi efficace ottimizzare i parametri tempo/temperatura utilizzando 60°C per almeno 40-60 secondi. Tale accorgimento, associato ad una regolazione del pH dei prodotti intorno a valori di 5-6, all'aggiunta di conservanti e alla sterilizzazione UV, è in grado di garantire la salubrità del prodotto per almeno 180 giorni. E' tuttavia da precisare che il metodo di sterilizzazione UV ha un'efficienza notevolmente ridotta nei prodotti aventi un'umidità relativa superiore a 60%; per tale motivo, sono stati sperimentati sistemi alternativi ai raggi UV, quali l'utilizzo dell'ozono, o la sterilizzazione con raggi a ultrasuono. Ad oggi, tuttavia, l'unico metodo in grado di garantire con certezza una buona conservazione di questi prodotti è il loro confezionamento sottovuoto associato al mantenimento della catena del freddo in tutte le fasi di lavorazione, trasporto e distribuzione.

La composizione chimica dei prodotti a base di medusa che hanno subito le lavorazioni descritte in precedenza risulta molto diversa da quella dei prodotti freschi (Hsieh & Rudloe, 1994). Questi ultimi, infatti, contengono un'altissima percentuale di acqua (da 95 a 98% in relazione alla specie considerata) e una quantità di sale pari al 2-3%, approssimativamente in equilibrio osmotico con l'acqua marina (Robertson, 1939). Il contenuto delle altre sostanze organiche è estremamente basso: la quantità di proteine si aggira intorno all'1-1,3% (Wootton *et al.*, 1982), mentre i lipidi vanno dallo 0,0046% allo 0,2% (Hooper & Ackman, 1973). La quantità di colesterolo risulta inferiore a 0,35mg/100g (Hsieh & Rudloe, 1994).



a



b

Fig. 2.4 (a,b): Prodotti Ready to eat (RE) acquistati a Prato in data 25/02/2013 In primo piano ben visibile la denominazione Hai Zhe (medusa) Tou,(cappello)

I prodotti commerciali a base di medusa contengono invece 68% di acqua, 5,5% di proteine e fino al 25% di sale (Huang, 1988) anche se è opportuno precisare che essi non vengono consumati come tali, ma sottoposti ad un lavaggio in acqua per almeno 60 minuti direttamente dal consumatore o, caso ancora più frequente, consumati come prodotti *Ready to eat*, che sono stati opportunamente desalati e reidratati durante il ciclo produttivo prima del confezionamento e che contengono solo 0,26% di sale (Hsieh & Rudloe, 1994). Anche in questo caso il contenuto di colesterolo non supera 0,37mg/100g, una quantità estremamente bassa paragonata a tutti gli altri prodotti ittici (Hsieh & Rudloe, 1994). La medusa dunque, essendo praticamente priva di grassi, risulta un alimenti a basso tenore calorico (Castigliego *et al.* 2009). E' stato calcolato infatti che 100 gr di medusa contengano appena 20Kcal (Li & Hsieh, 2004).

La frazione proteica dei prodotti a base di medusa (freschi o processati) è costituita quasi interamente da collagene (80-90% delle proteine totali), componente essenziale della mesoglea, in grado di trattenere enormi quantità di acqua. Se da un punto di vista prettamente nutrizionale il collagene è una proteina di scarso valore biologico, risulta tuttavia importante sotto l'aspetto delle potenzialità terapeutiche, essendo costituente essenziale dei tessuti molli, cartilaginei ed ossei (Hsieh & Rudloe, 1994). Si tratta di un composto dotato di un'ottima bioattività, biocompatibilità, penetrabilità e capacità ripartiva (Zhuang *et al.*, 2009). La medicina moderna ha mostrato sempre interesse allo studio di tali proprietà, soprattutto in relazione a ricerche relative alla guarigione delle ferite nonchè

alla cura di patologie ossee ed articolari, neoplasie, processi fibrotici, emostatici e trombotici (Hsieh & Rudloe 1994). Il consumo di medusa si è infatti dimostrato un valido sostegno nella cura di artrite, ipertensione, mal di schiena, ulcera, tracheite, bronchite ed asma, nonché in grado di ritardare l'invecchiamento della pelle (You *et al.* 2007). Con queste premesse non si può escludere che questo prodotto possa un giorno ritrovarsi anche nella Grande Distribuzione Organizzata (GDO) occidentale (Kawahara *et al.*, 2006). A titolo d'esempio, alcuni degli effetti benefici indicati da studi condotti da You *et al.* 2007, Hsieh & Rudloe 1994, Hsieh *et al.* 2001 sono riassunti nella seguente tabella.

Sistema respiratorio	Notevole riduzione di insorgenza di malattie respiratorie associate all'asma, soprattutto nei bambini.
Occhio e sistema nervoso	Presenza di acidi grassi Omega-3, composti essenziali per occhio e tessuto cerebrale. Minore insorgenza di demenza ed altre malattie associate all'età negli anziani.
Sistema cardiovascolare	Ridotta formazione di coaguli sanguigni; riduzione della pressione arteriosa; prodotto privo di colesterolo che può essere consumato da soggetti cardiopatici.
Infiammazioni	Presenza di collagene utile nel trattamento delle artriti.
Diabete	Prodotto povero di zuccheri (riduzione delle quantità di glucosio ematico)

Tab 2.4: Principali benefici legati al consumo regolare di medusa.

2.3.1 Effetti avversi legati al consumo di medusa: l' Alluminio

Le tecniche di lavorazione dei prodotti a base di medusa prevedono l'utilizzo di allume, ossia solfato di alluminio dodecaidrato. Gli additivi alimentari contenenti alluminio, infatti, vengono utilizzati da secoli, grazie alle loro proprietà rassodanti, stabilizzatrici ed antiagglomeranti ed il loro impiego è consentito praticamente in tutto il mondo.

L'alluminio è un metallo bianco argenteo, duttile, malleabile, non magnetico e non combustibile che costituisce il tredicesimo elemento della tavola periodica. In natura, data la sua forte reattività, non lo si trova allo stato puro, bensì nella sua forma ossidata Al^{3+} (Giordano *et al.*, 1993), la quale si presta bene a formare un'estrema varietà di complessi, tra loro radicalmente differenti, con elementi alliganti presenti nei sistemi biologici e/o negli alimenti. In particolare, lo ione Al^{3+} forma i legami più stabili con le altre molecole nei mezzi acquosi. Questa particolare capacità fa sì che l'alluminio sia uno dei metalli più abbondantemente presenti nella crosta terrestre, dove si trova complessato con silicati, idrossidi, fosfati e sotto forma di criolite (WHO, 1997

<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc194.htm>). I processi naturali come l'erosione del suolo e delle rocce, l'attività vulcanica e le stesse piogge, ma anche l'estrazione dalle miniere per usi industriali, possono causare la ridistribuzione dei composti di alluminio in altri compartimenti ambientali, quali l'acqua e l'aria, nonché a livello degli organismi vegetali ed animali.

L'alluminio si presta bene a molteplici processi di lavorazione grazie alle sue proprietà tecnologiche che lo rendono, come già accennato, duttile e malleabile. Esso può infatti essere lavorato a caldo o a freddo, oltre che plasmato in una grande quantità di forme e trasformato in lamine sottilissime fino a 0,005 mm. Per tali motivi viene impiegato a livello industriale in varie attività, quali il trattamento dell'acqua o la fabbricazione della carta, dei coloranti, dei medicinali e degli additivi alimentari. Esso trova inoltre largo impiego, principalmente sotto forma di leghe, con altri metalli, nella fabbricazione di utensili da cucina e di imballaggi per il confezionamento alimentare. L'alluminio è infatti il materiale ideale per gli imballaggi in quanto garantisce un ottimo effetto barriera che protegge il contenuto dalla luce, dall'aria e dall'umidità, garantendo lunghi periodi di conservazione senza far perdere la qualità ai prodotti. Inoltre, offre un alto rapporto prestazioni-peso, che garantisce la massima protezione aggiungendo peso minimo a quello del prodotto imballato. Gli imballaggi in alluminio hanno anche un ottimo impatto estetico, si prestano ad ogni tipo di personalizzazione e di informazione e possono essere riciclati molte volte, costituendo così un risparmio rilevante in termini di energia (www.CONAI.org sito del consorzio nazionale imballaggio). Nel confezionamento dei prodotti alimentari generalmente l'alluminio non si trova in diretto contatto con il contenuto dell'imballaggio, dal quale è separato attraverso un o più strati di plastica; tuttavia, nelle diverse fasi della preparazione dei prodotti alimentari, esso può inevitabilmente, seppure in minima parte, entrare nella composizione degli stessi, sia durante la fase di produzione industriale (contatto degli alimenti con pentole, utensili, macchinari, superfici) che a livello domestico (utilizzo di pentole, utensili da cucina, vassoi da forno, pellicole di imballaggio per cottura e refrigerazione). Un caso lampante di contatto diretto tra alluminio e prodotto alimentare si ha invece nel settore della ristorazione, per quanto riguarda i sempre più in voga prodotti *take-away*, i quali vengono spesso confezionati in vaschette per alimenti monouso in alluminio. L'entità di migrazione dell'alluminio dai contenitori di imballaggio agli alimenti sembra dipendere da diversi fattori, quali la durata di esposizione, la temperatura, la composizione e il pH dell'alimento stesso, nonché la presenza di altre sostanze quali acidi organici, sali ed altri ioni (EFSA, 2008).

La normativa comunitaria che disciplina l'utilizzo dell'alluminio e delle sue leghe nell'imballaggio dei prodotti alimentari è dettata dal **Regolamento (CE) n. 1935/2004** del Parlamento europeo e del Consiglio del 27 ottobre 2004 *“riguardante i materiali e gli oggetti destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari”*. Nell'articolo 3, il presente regolamento stabilisce che *“I materiali e gli oggetti devono essere prodotti conformemente alle buone pratiche di fabbricazione affinché, in condizioni d'impiego normali o prevedibili, essi non trasferiscano ai prodotti alimentari componenti in quantità tali da: a) costituire un pericolo per la salute umana; b) comportare una modifica inaccettabile della composizione dei prodotti alimentari o c) comportare un deterioramento delle loro caratteristiche organolettiche”* (Regolamento CE n. 1935/2004).

La norma internazionale **EN 601:2004**, recepita a livello nazionale con quella **UNI EN 601:2007**, specifica il *“massimo valore del contenuto di massa degli elementi di lega e delle impurità di materiali fusi e oggetti destinati al contatto con alimenti, in alluminio e leghe di alluminio”* (EN 601:2004).

Alcuni composti dell'alluminio (solfato di alluminio; solfato di sodio e alluminio; solfato di potassio e alluminio; solfato di ammonio e alluminio; fosfato di sodio e alluminio; silicati di sodio, potassio, calcio e alluminio) sono autorizzati all'impiego quali additivi alimentari ai sensi della **Direttiva 95/2/CE** del Parlamento europeo e del Consiglio del 20 febbraio 1995 *“relativa agli additivi alimentari diversi dai coloranti e dagli edulcoranti”*, che ne stabilisce anche le modalità di impiego e le dosi massime consentite.

In sintesi, sia che l'alluminio sia già presente negli alimenti per via naturale (frutta, verdure, cereali e carni), sia che ne venga in contatto attraverso le lavorazioni industriali o gli imballaggi, sia infine che ne costituisca parte integrante a seguito del suo impiego quale additivo, la via principale di esposizione del metallo per la popolazione è appunto quella alimentare. La maggior parte degli alimenti non trasformati contiene di norma meno di 5 mg di alluminio per chilogrammo; concentrazioni più elevate (livelli medi compresi tra 5 e 10 mg/kg) sono state frequentemente riscontrate nel pane, nei dolci da forno e nella pasticceria (con valori più elevati nei biscotti), in alcuni tipi di verdura (funghi, spinaci, ravanelli, bietola e lattuga), frutta glassata, prodotti caseari, salsicce, frattaglie, molluschi, cibi ricchi di zuccheri, nei preparati per panificazione e nella maggior parte dei farinacei e delle farine (EFSA, 2008). E' opportuno tuttavia sottolineare che sono state osservate ampie variazioni nell'ambito dei diversi alimenti e, soprattutto, dei diversi Paesi di produzione; quest'ultima considerazione è abbastanza plausibile sulla base del fatto che, al di fuori della Comunità Europea, i livelli medi tollerati di alluminio sono differenti nelle varie normative nazionali, così come differente è il tipo di utilizzo che viene fatto di questo

metallo in ambito alimentare (imballaggi, additivi ecc.). Come conseguenza di quanto detto, non è dunque ad oggi possibile stabilire con esattezza la precisa quantità di alluminio contenuta in un determinato prodotto alimentare (EFSA, 2008).

L'esposizione alimentare complessiva all'alluminio (da tutte le fonti) della popolazione europea è stata calcolata in base a studi condotti nei vari Stati membri; negli adulti (non sottoposti ad esposizione professionale) sono state evidenziate ampie variazioni tra i vari Paesi e nell'ambito dello stesso paese, con un'esposizione media giornaliera che varia da 1,6 a 13 mg di alluminio, che corrispondono a 0,2-1,5 mg/Kg di peso corporeo la settimana. Dagli stessi studi è inoltre risultato che, nella popolazione generale, sono i cereali ed i prodotti a base di cereali, le verdure e le bevande gli alimenti che contribuiscono maggiormente (>10%) all'esposizione alimentare all'alluminio (EFSA, 2008).

Dopo l'assorbimento, l'alluminio si distribuisce in tutti i tessuti degli animali e dell'uomo, trasportato nel plasma dalla proteina legante il ferro, la transferrina. Si accumula poi in alcuni di essi, in particolare nelle ossa, dove è in grado di persistere molto a lungo prima di essere escreto con l'urina; l'alluminio è inoltre in grado di penetrare nel cervello e di raggiungere la placenta ed il feto (EFSA, 2008). Esposizioni prolungate e ripetute possono esitare in patologie a carico del sistema nervoso con deficit di apprendimento (diffuso tra i bambini), incoordinazione motoria, scarsa memoria, confusione mentale (recenti studi hanno riscontrato nelle autopsie di pazienti affetti dal morbo di Alzheimer un significativo aumento di alluminio nel cervello), cefalee, disturbi neuromuscolari, problemi digestivi, anemie (interferenza con il metabolismo del ferro), emolisi, carie dentaria (l'alluminio compete con il fluoro impedendone l'assorbimento), ipoparatiroidismo, disfunzioni renali, osteomalacia (con conseguente incremento di fratture ossee) (www.sanitalia.it).

Sebbene a livelli elevati di esposizione alcuni composti possano, *in vitro* e *in vivo*, danneggiare il DNA tramite meccanismi indiretti (vedi Capitolo x, paragrafo "inibitori") il gruppo di esperti scientifici sugli additivi alimentari, gli aromatizzanti, i coadiuvanti tecnologici e i materiali a contatto con gli alimenti (gruppo di esperti AFC) ha ritenuto improbabile che ciò sia rilevante per le persone esposte all'alluminio con l'alimentazione.

Sulla base di tale rischio sanitario gli esperti scientifici dell'*European Food Safety Authority* (EFSA) hanno, nel comunicato stampa del 15 Luglio 2008, fissato ad 1 milligrammo di alluminio per chilogrammo di peso corporeo la dose settimanale tollerabile **TWI** (considerata la persistenza nell'organismo è stato ritenuto opportuno fissare una dose settimanale tollerabile anziché una dose giornaliera tollerabile) (EFSA, 2008).

In virtù del rischio sanitario associato al consumo di alluminio, nei prodotti a base di medusa è stato fissato un limite di 1,2-2,2% ().

2.3.2 Rischi microbiologici

Per quanto riguarda l'aspetto sanitario del prodotto, i risultati delle analisi microbiologiche effettuate sui campioni di medusa (Castigliego *et al.*, 2009) evidenziano complessivamente una condizione igienico sanitaria discreta per ciò che concerne i criteri microbiologici di sicurezza previsti dai regolamenti CE 2073/2005 e 1441/2007 in quanto sono risultati assenti sia *Salmonella* spp. sia *Listeria monocytogenes* (come era auspicabile e prevedibile in prodotti in salamoia o salati e commercializzati sotto vuoto come i *Ready to eat*) ed anche altri parametri, quali carica aerobia mesofila, coliformi totali, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus* spp., bacilli totali, batteri lattici, clostridi solfito riduttori, specie fungine, chemioantibiotici e sostanze inibenti ad attività antibatterica, si sono dimostrati assenti o presenti in quantità modeste.

CAPITOLO 3

SICUREZZA DEGLI ALIMENTI E NORMATIVA COMUNITARIA

Il ripetuti episodi di adulterazione, sofisticazione e contaminazione alimentare e le gravi crisi alimentari che, dall'encefalopatia spongiforme bovina (BSE) all'influenza aviaria, hanno investito il settore alimentare nel corso degli ultimi anni, hanno spinto le istituzioni comunitarie a fare della sicurezza alimentare una delle grandi priorità del programma politico europeo, partendo dal presupposto che ogni cittadino abbia diritto ad un'alimentazione sana, di qualità e variata e che ogni tipo di informazione sulla composizione, sul processo di fabbricazione e sull'impiego dei prodotti alimentari debba risultare chiara e precisa.

Ciò ha portato, negli anni, ad una rivisitazione dell'intero quadro normativo alimentare, con l'attuazione di un sistema in grado di garantire ai consumatori prodotti alimentari sicuri lungo l'intero percorso di filiera (*from farm to fork*); tale sistema si basa sull'applicazione di un metodo scientifico, che prevede la valutazione, la gestione e la comunicazione del rischio ed ha come punti fondamentali la responsabilizzazione del produttore, il controllo di filiera, la rintracciabilità dei percorsi degli alimenti, dei mangimi e dei loro ingredienti, i sistemi di allarme rapido sui rischi alimentari e l'informazione nei confronti del consumatore.

3.1. LE TAPPE DELLA SICUREZZA ALIMENTARE NELL'UE

Con la stesura del “ **Libro bianco sulla sicurezza alimentare**” del 13 gennaio 2000, la Commissione europea ha avanzato le sue prime proposte di riforma in campo alimentare. Tale provvedimento comunitario, infatti, propone una serie di misure che hanno consentito di organizzare la sicurezza alimentare in modo più coordinato ed integrato. L'obiettivo principale è stato quello di fissare dei principi comuni alle legislazioni alimentari europee per perseguire un livello elevato di tutela della salute, assicurando una base normativa orizzontale ed eliminando impostazioni divergenti. In particolare, è stata sollevata l'esigenza di istituire un organismo indipendente che fornisca garanzie sulla non nocività degli alimenti immessi in commercio, che informi i consumatori sulla gestione sanitaria del rischio e che sia in grado di garantire la costituzione di un sistema ufficiale di controllo in ogni Stato.

Tali obiettivi si sono concretizzati con l’emanazione del **Regolamento (CE) n. 178/2002** del Parlamento europeo e del Consiglio, del 28 gennaio 2002 (c.d. *General Food Law*), che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l’Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare. Per comprendere l’importanza del succitato Regolamento è sufficiente analizzare alcune definizioni in esso riportate e alla base di tutta la normativa successivamente sviluppata a livello comunitario (Tab 3.1)

Alimento
<i>“qualsiasi sostanza o prodotto trasformato, parzialmente trasformato o non trasformato, destinato ad essere ingerito, o di cui si prevede ragionevolmente che possa essere ingerito da essere umani”</i> (Art.2)
Impresa alimentare
<i>“ogni soggetto pubblico o privato, con o senza fini di lucro, che svolge una qualsiasi delle attività connesse ad una delle fasi di produzione, trasformazione e distribuzione degli alimenti”</i> (Art.3.2)
Operatore del settore alimentare
<i>“la persona fisica o giuridica responsabile di garantire il rispetto delle disposizioni della legislazione alimentare posta sotto il suo controllo”</i> (Art. 3.3)
Commercio al dettaglio
<i>“la movimentazione e/o trasformazione degli alimenti e il loro stoccaggio nel punto di vendita o di consegna al consumatore finale, compresi i terminali di distribuzione, gli esercizi di ristorazione, le mense di aziende e istituzioni, i ristoranti e altre strutture di ristorazione analoghe, i negozi, i centri di distribuzione per supermercati e i punti vendita all’ingrosso”</i> (Art.3.7)
Immissione sul mercato
<i>“la detenzione degli alimenti o mangimi a scopo di vendita, comprese l’offerta di vendita o ogni altra forma, gratuita o a pagamento, di cessione, nonché la vendita stessa, la distribuzione e le altre forme di cessione propriamente detta”</i> (Art. 3.8)
Rischio
<i>“funzione della probabilità e della gravità di un effetto nocivo per la salute, conseguente alla presenza di un pericolo”</i> (Art. 3.9)
Pericolo o elemento di pericolo
<i>“Agente biologico, chimico o fisico contenuto in un alimento o mangime, o condizione in cui un alimento o un mangime si trova, in grado di provocare un effetto nocivo sulla salute”</i> (Art. 3.14)
Fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione
<i>“qualsiasi fase, importazione compresa, a partire dalla produzione primaria di un alimento inclusa fino al magazzinaggio, al trasporto, alla vendita o erogazione al consumatore finale inclusi e, ove pertinente, l’importazione, la produzione, la lavorazione, il magazzinaggio, il trasporto, la distribuzione, la vendita e l’erogazione dei mangimi”</i> (Art. 3.16)
Produzione primaria
<i>“tutte le fasi della produzione, dell’allevamento o della coltivazione dei prodotti primari, compresi il raccolto, la mungitura e la produzione zootecnica precedente la macellazione e comprese la caccia e la pesca e la raccolta di prodotti selvatici”</i> (Art. 3.17)
Consumatore finale
<i>“il consumatore finale di un prodotto è colui che non utilizza tale prodotto nell’ambito di un’operazione o attività di impresa del settore alimentare”</i> (Art. 3.18)

Tab. 3.1: Principali definizioni del Reg. CE 178/2002

La vera rivoluzione apportata dal presente regolamento è stata quella di considerare l’intera catena della produzione alimentare (filiera), estendendo il campo di applicazione della disciplina dell’igiene ai mangimi e al settore primario, e non solo alle fasi ad esso

successive. Il testo del regolamento CE 178/2002 cita infatti quale campo di applicazione *“tutte le fasi della produzione agricola, della trasformazione e della distribuzione degli alimenti e dei mangimi prodotti per animali destinati alla produzione alimentare”* (Art. 4.3), sottolineando l'importanza di prendere in considerazione tutto il percorso di un prodotto alimentare.

3.1.1 La Rintracciabilità degli alimenti

“L'esperienza ha dimostrato che l'impossibilità di ricostruire il percorso compiuto da alimenti e mangimi può mettere in pericolo il mercato interno di tali prodotti. Occorre quindi predisporre un sistema generale per la rintracciabilità dei prodotti che abbracci il settore dei mangimi e alimentare, onde poter procedere a ritiri mirati e precisi o fornire informazioni ai consumatori o ai funzionari responsabili dei controlli, evitando così disagi più estesi e ingiustificati quando la sicurezza degli alimenti sia in pericolo” (Reg. CE n. 178/2002)

A tal proposito, Il 1° Gennaio 2005 è entrato in vigore l'art. 18 del succitato Regolamento, che rende obbligatoria la rintracciabilità di alimenti e mangimi, intesa come *“la possibilità di ricostruire e seguire il percorso di un alimento, di un mangime, di un animale destinato alla produzione alimentare o di una sostanza destinata o atta ad entrare a far parte di un alimento o di un mangime attraverso tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione”*. Tale nuova definizione scaturisce appunto dal fatto che *“Per garantire la sicurezza degli alimenti occorre considerare tutti gli aspetti della catena di produzione alimentare come un unico processo, a partire dalla produzione primaria inclusa, passando per la produzione di mangimi fino alla vendita o erogazione di alimenti al consumatore inclusa, in quanto ciascun elemento di essa rappresenta un potenziale impatto per la sicurezza alimentare”*. Anche se nei testi di legge la rintracciabilità comincia ad essere presa in considerazione a partire dal 1991 con il Reg. CEE n. 2092/91 relativo ai metodi di produzione biologica, e, successivamente nel comparto ittico con il Reg. CE n. 104/2000, il Reg. CE n. 178/2002 ha tuttavia il merito di avere esteso l'obbligo di rintracciabilità a tutti i prodotti alimentari, compresi i mangimi, in un'ottica legislativa orizzontale.

Tutti gli operatori della filiera devono dunque essere in grado di identificare i fornitori e i clienti diretti dei loro prodotti e devono dotarsi di sistemi e procedure che consentano di mettere a disposizione delle autorità competenti, qualora venga loro richiesto, tutte le informazioni al riguardo, in previsione di idonee procedure per il ritiro dal mercato di alimenti e mangimi a rischio.

3.1.2 I nuovi obblighi degli operatori del settore alimentare

Altra novità rispetto alla normativa passata risiede nel fatto che l'Operatore del Settore Alimentare, da qui in poi conosciuto come OSA, diventa giuridicamente responsabile della conformità igienico-sanitaria degli alimenti che produce (Tab 3.2). L'OSA, infatti, deve applicare tale legislazione in tutte le fasi della filiera, ovvero durante la produzione, la trasformazione, il trasporto, la distribuzione e la fornitura degli alimenti. Se inoltre un operatore ritiene che un alimento sia nocivo per la salute dell'uomo o degli animali, deve avviare immediatamente le procedure di ritiro dal mercato, informandone le autorità competenti e, laddove il prodotto possa già essere arrivato al consumatore, esso ne deve informare i consumatori ed essere in grado di richiamare i prodotti già forniti.

Soggetti obbligati al rispetto del Regolamento 178/2002	Tutti gli operatori del settore alimentare (compreso il settore primario) e dei mangimi
Obblighi degli operatori del settore alimentare (compreso il settore primario) e dei mangimi	<p>Dimostrare <u>da chi</u> hanno ricevuto un alimento o un mangime e <u>a chi</u> hanno fornito i loro prodotti:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Identificativo del fornitore/cliente diretto (es. sede sociale, stabilimento di provenienza dell'alimento, del mangime, dell'animale ecc.); • Natura e quantità dei beni ricevuti/venduti (es. denominazione, presentazione ecc.); • Data di ricevimento/vendita; • Indicazioni ai fini dell'individuazione del prodotto (es. partita, lotto, consegna ecc.); • Altre informazioni previste da norme specifiche.
Modalità di rispetto dell'obbligo	Obbligo espresso in termini di risultato; non è prescritto l'uso di specifici mezzi (sistemi di archiviazione dei documenti, codici a barre, strumenti elettronici ecc.).

Tab.3.2: Quadro di sintesi del Reg. CE 178/02: l'obbligo della rintracciabilità. Fonte: Dintec Camera di Commercio di Genova.

3.1.3 I materiali e gli oggetti destinati a venire in contatto con i prodotti alimentari (MOCA)

Sebbene non oggetto del Reg. CE n. 178/2002, si ritiene utile inserire un breve cenno alla rintracciabilità degli imballaggi, introdotta dal **Regolamento CE n. 1935/2004** del Parlamento europeo e del Consiglio del 27 ottobre 2004 e resa obbligatoria a partire dal 26 ottobre 2006. Il Reg. CE n. 1935/2004 riguarda infatti *“i materiali e gli oggetti destinati a venire in contatto con i prodotti alimentari ed abroga le Direttive 80/590/CE e 89/109/CE”*.

Il meccanismo è dunque lo stesso previsto dal Reg. CE n. 178/2002 per gli alimenti, ovvero, quello della rintracciabilità “ad anelli”: ogni operatore deve consentire all'Autorità di controllo l'identificazione dell'anello precedente e di quello successivo al proprio nell'ambito della filiera.

“La rintracciabilità degli imballaggi e dei materiali a contatto con gli alimenti è uno strumento importante per prevenire il rischio igienico-sanitario di un alimento poiché consente di risalire ai fornitori ed ai destinatari dei materiali stessi. Tutti gli operatori coinvolti nella produzione, assemblaggio, distribuzione, di materiali che vanno a contatto con gli alimenti devono essere in grado di comunicare, all’Autorità competente responsabile del controllo, i riferimenti dei propri fornitori e dei destinatari, con esclusione dei consumatori finali ” (Reg. CE n. 1935/2004)

3.1.4 L’analisi del rischio

La nuova legislazione alimentare e le decisioni prese in ambito di sicurezza si basano sull’analisi del rischio. L’analisi del rischio è un processo che si svolge in maniera indipendente, obiettiva e trasparente, e si basa su prove scientifiche disponibili. Il primo documento ufficiale in cui si parla di analisi del rischio (*risk analysis*) e della sua applicazione nel campo della sicurezza alimentare risale al 1995 (FAO/WHO, 1995). Tuttavia, il primo documento che costituisce il punto di riferimento essenziale per la valutazione del rischio (*risk assessment*) è stato pubblicato dalla *Codex Alimentarius Commission* (FAO/WHO, 1999). Nel suo “*Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk assessment*”, si è cercato infatti di standardizzare e raccogliere in un unico schema le metodologie proposte dai diversi organismi. In ambito comunitario i concetti di *risk analysis* e *risk assessment* sono stati anch’essi introdotti dal Reg. CE n. 178/2002, a seguito del quale l’analisi del rischio è diventata uno strumento fondamentale per valutare i problemi e per prendere delle decisioni in ambito alimentare. In particolare, l’analisi del rischio è stata introdotta dall’art. 6, e comprende tre fasi principali, tra loro interconnesse, che forniscono una metodologia sistematica per definire provvedimenti o altri interventi a tutela della salute, in modo efficace, proporzionato e mirato (Bergamo & Moriconi, 2012):

1. la **valutazione del rischio**, una valutazione scientifica degli effetti avversi per la salute, noti o potenziali, che risultano dall’esposizione umana a pericoli trasmessi dagli alimenti. Il processo include le seguenti fasi:
 - *Identificazione del pericolo*: effetti avversi sulla salute associati ad un particolare agente;
 - *Caratterizzazione del pericolo*: valutazione qualitativa e/o quantitativa della natura degli effetti avversi;
 - *Valutazione dell’esposizione*: valutazione qualitativa e /o quantitativa del grado assunzione che probabilmente si verifica; in campo alimentare la via di esposizione essenziale è quella digestiva. Viene stabilita la correlazione tra la concentrazione di

agenti chimici e/o fisici e/o microbiologici presenti nell'alimento, la quantità di alimenti ingeriti, la durata dell'ingestione di alimenti contaminati e la numerosità dei soggetti esposti (Bergamo & Moriconi, 2012).

- *Caratterizzazione del rischio*: integrazione delle fasi precedenti in una stima degli effetti avversi che è probabile si verifichino in una data popolazione.
2. la ***gestione del rischio***, intesa come direzione e controllo per gestire operativamente una situazione di crisi; tiene conto dei risultati della valutazione del rischio allo scopo di raggiungere gli obiettivi generali in materia di legislazione alimentare. Qualora in circostanze specifiche e a seguito della valutazione delle informazioni disponibili venga individuata la possibilità di effetti dannosi per la salute, ma permanga una situazione di incertezza sul piano scientifico, possono essere adottate, in attesa di ulteriori informazioni scientifiche per una valutazione più esauriente del rischio, le misure provvisorie di gestione del rischio, necessarie per garantire il livello elevato di tutela della salute che la Comunità persegue. Tali misure prevedono le sole restrizioni al commercio, e vengono riesaminate entro un periodo ragionevole, a seconda della natura del rischio e del tipo di informazioni scientifiche necessarie per risolvere la situazione di incertezza scientifica e per realizzare una valutazione del rischio più esauriente.
 3. la ***comunicazione del rischio***, che comprende la gestione delle procedure informative e di intervento dirette alle pubbliche amministrazioni e ai consumatori in caso di crisi.

3.1.5. L'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA)

Infine, sempre secondo le linee guida prefissate dal Libro Bianco sulla Sicurezza Alimentare del 2000, il Regolamento CE 178/2002 istituisce l'*Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare* (EFSA), che a partire dal 2005 ha sede a Parma, il cui compito è appunto quello di esprimere pareri scientifici ed assistenza tecnica in tutti i settori che abbiano un impatto sulla sicurezza alimentare. Essa costituisce una fonte indipendente di informazione e garantisce la comunicazione dei rischi al pubblico. L'EFSA ha inoltre il compito di coordinare la valutazione dei rischi ed identificare i rischi emergenti, fornire consulenza scientifica e tecnica alla Commissione, anche nell'ambito delle procedure di gestione delle crisi, raccogliere e pubblicare dati scientifici e tecnici nei settori della sicurezza alimentare, istituire delle reti europee di organismi attivi nel settore della sicurezza alimentare.

In questo contesto normativo le emergenze vengono gestite attraverso la rete informatica

“*Rapid alert system for food and feed*” (RASFF), che mette in comunicazione gli Stati membri, la Commissione e l’EFSA e consente scambi di informazioni riguardanti le misure necessarie a limitare l’immissione sul mercato o a ritirare gli alimenti dal mercato, coordinare gli interventi compiuti con esperti per regolamentare l’utilizzazione degli alimenti, il respingimento di una partita di prodotti alimentari ad un posto di frontiera dell’UE.

Il Regolamento (CE) n. 178/2002 è stato successivamente modificato da:

- **Regolamento (CE) n. 1642/2003** del Parlamento europeo e del Consiglio del 22 luglio 2003 “*Che modifica il regolamento(CE) n. 178/2002 che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l’Autorità per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare*”;
- **Regolamento (CE) n. 575/2006** della Commissione del 7 aprile 2006 “*Che modifica il regolamento(CE) n. 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio riguardo al numero e alla denominazione dei gruppi scientifici permanenti dell’Autorità europea per la sicurezza alimentare*”;
- **Regolamento (CE) n. 202/2008** della Commissione del 4 marzo 2008 “*Che modifica il regolamento(CE) n. 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio riguardo al numero e ai nomi dei gruppi di esperti scientifici dell’Autorità europea per la sicurezza alimentare*”;
- **Regolamento (CE) n. 596/2009** del Parlamento europeo e del Consiglio del 18 giugno 2009, “*Che adegua alla decisione 1999/468/CE del Consiglio determinati atti soggetti alla procedura di cui all’articolo 251 del trattato, per quanto riguarda la procedura di regolamentazione con controllo*”.

3.2 IL PACCHETTO IGIENE

Successivamente al Reg. CE n. 178/2002 sono stati emanati una serie di Regolamenti e Direttive, denominati “**Pacchetto igiene**”, con i quali il quadro giuridico della sicurezza alimentare si è completato con le nuove norme sui requisiti igienico-sanitari e sul sistema dei controlli ufficiali di alimenti e mangimi. Il pacchetto igiene, nel suo complesso, si applica alla produzione vegetale (primaria e trasformazione), animale (primaria e trasformazione) ed a quella dei mangimi. Entrato in vigore il 1° Gennaio 2006, è composto da:

Regolamento (CE) N. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 sull’igiene dei prodotti alimentari; non si applica alla produzione primaria per uso domestico privato, né alla preparazione e conservazione di alimenti per uso domestico

privato. Il Regolamento stabilisce in particolare quanto segue:

- Requisiti generali e specifici in materia di igiene, validi anche per la produzione primaria;
- Analisi dei pericoli e dei punti critici di controllo e conferma del sistema HACCP come strumento di analisi e controllo delle condizioni di igiene e sicurezza delle produzioni alimentari;
- Rimangono in vigore i manuali di buona prassi elaborati ai sensi della Direttiva 93/43/CEE;
- Viene promossa l'elaborazione e la divulgazione di manuali di buona prassi comunitari e nazionali, la cui applicazione rimane comunque volontaria.

Regolamento (CE) N. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene degli alimenti di origine animale: Carni (ungulati domestici, pollame e lagomorfi, selvaggina di allevamento e selvatica, prodotti a base di carne), molluschi bivalvi vivi, prodotti della pesca, latte e prodotti a base di latte, ovo prodotti, cosce di rana e lumache, grassi animali trasformati, gelatine, collagene. Non si applica alla produzione primaria per consumo domestico. Il Regolamento stabilisce quanto segue:

- Gli stabilimenti adibiti alle lavorazioni di prodotti animali devono essere riconosciuti dalle autorità nazionali competenti. Tale obbligo non si applica agli stabilimenti che esercitano unicamente attività di produzione primaria, trasporto, magazzinaggio di prodotti che non vanno stoccati a temperatura controllata;
- I prodotti di origine animale devono essere contrassegnati, nei casi previsti, da un apposito bollo sanitario apposto ai sensi del Regolamento CE n. 854/2004;
- Devono essere redatti elenchi di Paesi Terzi dai quali sono consentite le importazioni di prodotti animali. Il Regolamento stabilisce i requisiti di base per l'ammissione di un determinato paese terzo nel suddetto elenco; sono previste disposizioni specifiche per l'importazione di prodotti della pesca; i gestori dei macelli devono ottenere informazioni che consentano la rintracciabilità per le carni di tutte le specie da loro trattate, eccetto la selvaggina selvatica;
- Vengono definite le condizioni di lavorazione, stoccaggio, trasporto dei diversi tipi di prodotti di origine animale, precisando anche le temperature a cui tali operazioni devono essere effettuate.

Regolamento (CE) N. 854/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione dei controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano. Il Regolamento stabilisce quanto segue:

- Requisiti per il riconoscimento degli stabilimenti da parte delle Autorità competenti;
- Obbligo per gli operatori del settore alimentare di fornire alle Autorità tutta l'assistenza richiesta nell'esecuzione del controllo;
- I controlli sono basati sui principi del sistema HACCP;
- Compiti e responsabilità del veterinario ufficiale nel controllo delle carni fresche;
- Modalità e frequenza dei controlli da parte delle Autorità competenti riguardo ai seguenti alimenti di origine animale: molluschi bivalvi vivi, prodotti della pesca, latte e prodotti da esso derivati;
- Sanzioni in caso di mancato rispetto degli obblighi fissati dal Regolamento stesso;
- Completamento delle regole per l'importazione di prodotti di origine animale da Paesi Terzi stabilite dal Regolamento CE n. 853/2004.

Regolamento (CE) N. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 relativo ai controlli ufficiali destinati a verificare la conformità della normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali. Non si applica ai controlli ufficiali volti a verificare la conformità alle regole sull'organizzazione comune del mercato dei prodotti agricoli. Gli obiettivi sono quelli di prevenire o ridurre ad un livello accettabile i rischi derivati dall'ambiente per la salute umana ed animale, nonché garantire la trasparenza nel mercato degli alimenti e dei mangimi e la tutela degli interessi dei consumatori. Il Regolamento stabilisce in particolare quanto segue:

- Obblighi per i Paesi comunitari e scopi dei controlli ufficiali in materia di mangimi e alimenti;
- Criteri operativi per le Autorità competenti designate dai Paesi membri dell'UE per tali controlli;
- Accessibilità delle informazioni di pubblico interesse;
- Tutela delle informazioni soggette a segreto professionale;
- Requisiti dei metodi di campionamento e analisi;
- Elaborazione di misure attuate in caso i controlli rivelino rischi per la salute dell'uomo o degli animali;
- Completamento delle disposizioni della Direttiva 97/78/CEE in materia di controlli sui prodotti animali provenienti da Paesi Terzi, con riferimento ai mangimi ed ai prodotti di origine non animale importati da Paesi non facenti parte dell'UE;
- Istituzione di Laboratori comunitari a cui i Laboratori nazionali possono fare riferimento nella loro attività;

- Misure amministrative in materia di: elaborazione di Piani nazionali di controllo, formazione del personale addetto ai controlli, controlli da effettuarsi nei Paesi comunitari ed extracomunitari, sanzioni a livello comunitario.

Direttiva 2002/99/CE del Consiglio del 16 Dicembre 2002, che stabilisce norme di polizia sanitaria per la produzione, la trasformazione e l'introduzione di prodotti di origine animale destinati al consumo umano. Si applica anche agli animali vivi destinati al consumo umano. La Direttiva stabilisce in particolare quanto segue:

- I Paesi comunitari sono responsabili delle misure finalizzate all'eradicazione delle malattie animali e delle condizioni da osservare per i prodotti di origine animale;
- Casi in cui le Autorità statali possono richiedere certificati veterinari e relative modalità d'applicazione;
- Disposizioni per l'accertamento della conformità alle norme comunitarie dei prodotti animali importati da Paesi Terzi;
- Preparazione di elenchi di Paesi non facenti parte dell'UE che possono esportare prodotti di origine animale verso la Comunità, e requisiti che i Paesi extracomunitari devono presentare per essere compresi in tali elenchi.

Regolamento (CE) N. 183/2005 del Parlamento europeo e del Consiglio del 12 gennaio 2005 che stabilisce requisiti per l'igiene dei mangimi; questa normativa stabilisce quanto segue:

- Gli obblighi per gli operatori del settore dei mangimi riguardo al mantenimento di corrette condizioni di igiene nella lavorazione e nella minimizzazione del rischio di contaminazione dei prodotti;
- L'applicazione del sistema HACCP alla produzione di mangimi, con esclusione della produzione primaria;
- Additivi autorizzati nella produzione di mangimi;
- Obbligo di notifica per gli operatori all'Autorità competente degli stabilimenti in loro possesso, nonché fornitura di informazioni aggiornate in merito; il riconoscimento degli stabilimenti da parte dell'Autorità è condizione indispensabile per l'esercizio dell'attività;
- Modalità di riconoscimento;
- Casi in cui il riconoscimento può essere sospeso, revocato o modificato;
- Preparazione di manuali nazionali e comunitari di corretta prassi igienica;
- Regole per l'importazione e l'esportazione; in particolare, i mangimi devono essere importati da un Paese Terzo presente in un elenco redatto ai sensi del Regolamento CE n. 882/2004, devono essere prodotti in uno stabilimento riconosciuto e devono

soddisfare i requisiti di igiene stabiliti dalla Comunità.

Regolamento (CE) N. 2073/2005 del Parlamento europeo e del Consiglio del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari. Il presente Regolamento aggiorna ed armonizza i criteri microbiologici dei prodotti alimentari contenuti nelle precedenti direttive comunitarie e per la prima volta tali criteri sono formulati anche riguardo ai prodotti vegetali; si rivolge a tutti gli operatori del settore alimentare che operano nelle diverse fasi della filiera quali lavorazione, fabbricazione, manipolazione compreso la fase della vendita al dettaglio e della distribuzione. In Tabella 3.3 sono riportate le principali definizioni espresse nel regolamento.

Microrganismi
<i>“i batteri, i virus, i lieviti, le muffe, le alghe, i protozoi parassiti, gli elminti parassiti microscopici, le loro tossine e i loro metaboliti”.</i>
Partita
<i>“un gruppo o una serie di prodotti identificabili ottenuti mediante un determinato processo in circostanze praticamente identiche e prodotti in un luogo determinato entro un periodo di produzione definito”.</i>
Conservabilità
<i>“il periodo che corrisponde al periodo che precede il termine minimo di conservazione o la data di scadenza, come definiti rispettivamente agli articoli 9 e 10 della direttiva 2000/13/CE”.</i>
Alimenti pronti
<i>“i prodotti alimentari destinati dal produttore o dal fabbricante al consumo umano diretto, senza che sia necessaria la cottura o altro trattamento per eliminare o ridurre a un livello accettabile i microrganismi presenti”.</i>
Campione
<i>“una serie composta di una o più unità o una porzione di materia selezionate tramite modi diversi in una popolazione o in una quantità significativa di materia e destinate a fornire informazioni su una determinata caratteristica della popolazione o della materia oggetto di studio e a costituire la base su cui fondare una decisione relativa alla popolazione o alla materia in questione o al processo che le ha prodotte”.</i>
Campione rappresentativo
<i>“un campione nel quale sono mantenute le caratteristiche della partita dalla quale è prelevato, in particolare nel caso di un campionamento casuale semplice, dove ciascun componente o aliquota della partita ha la stessa probabilità di figurare nel campione”.</i>
Criterio microbiologico
<i>“definisce l'accettabilità di un prodotto, di una partita di prodotti alimentari o di un processo, in base all'assenza, alla presenza o al numero di microrganismi, e/o in base alla quantità delle relative tossine/metaboliti, per unità di massa, volume, superficie o partita”.</i>
Conformità ai criteri microbiologici
<i>“l'ottenimento di risultati soddisfacenti o accettabili di cui all'allegato I nei controlli volti ad accertare la conformità ai valori fissati per i criteri mediante il prelievo di campioni, l'effettuazione di analisi e l'attuazione di misure correttive”.</i>

Tab.3.3: Definizioni Reg. CE n. 2073/2005 (Art.2)

Il Regolamento stabilisce quanto segue:

- Limiti di concentrazione di microrganismi nei prodotti alimentari;
- Limiti di concentrazione di microrganismi nelle varie fasi del processo di lavorazione dei seguenti alimenti: carni e prodotti derivati, latte e prodotti derivati, prodotti a base di uova, prodotti della pesca (prodotti sgusciati di crostacei e

molluschi), ortaggi e frutta e prodotti derivati;

- Modalità di esecuzione del campionamento, metodi di analisi e criteri di interpretazione dei risultati delle prove;
- Azioni correttive in caso di risultati non soddisfacenti i criteri stabiliti;
- Informazioni da presentare in etichetta;
- Deroghe ai limiti di concentrazione di microrganismi;
- Analisi da parte degli operatori dell'andamento dei risultati delle prove;

Il Regolamento è stato rivisto ed aggiornato, alla luce dei progressi tecnico-scientifici, dal Regolamento CE n. 1441/2007 per tenere conto delle evidenze scientifiche più recenti.

Regolamento (CE) N. 2074/2005 del Parlamento europeo e del Consiglio del 5 dicembre 2005 recante modalità di attuazione relative ad alcuni prodotti di cui al regolamento (CE) N. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio e all'organizzazione di controlli ufficiali a norma dei regolamenti del Parlamento europeo e del Consiglio (CE) N. 854/2004 e (CE) N. 882/2004, deroga al regolamento (CE) N. 852/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio e modifica dei regolamenti (CE) N. 853/2004 e (CE) N. 854/2004.

Il Regolamento stabilisce quanto segue:

- Gli obblighi per gli operatori del settore dei prodotti della pesca riguardo all'attuazione dei controlli visivi per l'individuazione di parassiti non indicati nei Regolamenti CE n. 853/2004 e 854/2004;
- I valori limite delle concentrazioni di azoto basico volatile totale per alcuni prodotti della pesca, nonché i metodi di analisi per determinare tali concentrazioni non specificati nei Regolamenti CE n. 853/2004 e 854/2004;
- I metodi di analisi per la determinazione delle biotossine marine, non indicati dai Regolamenti CE n. 853/2004 e 854/2004;
- Il tenore di calcio delle carni separate meccanicamente, non indicato nel Regolamento CE n. 853/2004;
- I requisiti degli elenchi di stabilimenti alimentari riconosciuti per i prodotti d'origine animale, con istituzione di un sito web della Commissione collegato con i siti degli Stati nazionali che riportano tali elenchi, non specificato nel Regolamento CE n. 882/2004;
- I modelli dei certificati sanitari per l'importazione di cosce di rana, lumache, gelatina e collagene e di materie prime per la produzione di gelatina e collagene, non specificati nel Regolamento CE n. 853/2004;
- Le definizioni dei prodotti alimentari che presentano caratteristiche tradizionali, le caratteristiche degli stabilimenti di produzione di questi alimenti, modalità delle

operazioni di pulizia, la notificazione delle concessioni di deroga a detti stabilimenti da parte degli Stati membri riguardo agli obblighi stabiliti dal Regolamento CE n. 852/2004.

Regolamento (CE) N. 2075/2005 del Parlamento europeo e del Consiglio del 5 dicembre 2005 che definisce norme specifiche applicabili ai controlli ufficiali relativi alla presenza di Trichine nelle carni;

Regolamento (CE) N. 2076/2005 del Parlamento europeo e del Consiglio del 5 dicembre 2005 che fissa disposizioni transitorie per l'attuazione dei regolamenti del parlamento europeo e del Consiglio (CE) N. 853/2004, (CE) 854/2004, (CE) 882/2004 e che modifica i regolamenti (CE) N. 853/2004 e (CE) N. 854/2004;

Direttiva 2004/41/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 21 aprile 2004, che abroga alcune direttive recanti norme sull'igiene dei prodotti alimentari e le disposizioni sanitarie per la produzione e la commercializzazione di determinati prodotti di origine animale destinati al consumo umano e che modifica le direttive 89/662/CEE e 92/118/CEE e la decisione 95/408/CE del Consiglio .

Regolamento (CE) N. 1662/2006 della Commissione del 6 novembre 2006, recante modifica del regolamento CE n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale. Tali modifiche riguardano:

- Condizioni di lavorazione per le carni bovine e suine;
- Norme per la produzione e commercializzazione dell'olio di pesce;
- Requisiti sanitari relativi alla produzione di latte crudo e colostro e prodotti da questi derivati; vengono inoltre indicati i valori di temperatura di stoccaggio e di trasporto per il colostro;
- Criteri per il confezionamento, l'imballaggio, l'etichettatura e la marchiatura del latte crudo, del colostro e dei prodotti da essi derivati;
- Adozione di un nuovo processo di produzione del collagene.

Regolamento (CE) N. 1663/2006 della Commissione del 6 novembre 2006, recante modifica del regolamento CE n. 854/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione dei controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano; tali modifiche riguardano:

- Ispezione *post mortem* sulle carcasse e sulle frattaglie di bovini;
- Controlli sulla produzione di latte crudo e colostro e prodotti da essi derivati;
- Certificati di accompagnamento di prodotti alimentari di origine animale importati dai Paesi terzi.

Regolamento (CE) N. 1664/2006 della Commissione del 6 novembre 2006, recante modifica del regolamento CE n. 2074/2005 per quanto riguarda le misure di attuazione per taluni prodotti di origine animale destinati al consumo umano e che abroga talune misure di attuazione; tali modifiche riguardano:

- Modelli di certificati sanitari per l'importazione di alcuni prodotti di origine animale: cosce di rana e lumache, gelatina, collagene, prodotti della pesca, molluschi bivalvi vivi e miele e altri prodotti apicoli; vengono inoltre abrogate decisioni relative all'importazione di prodotti della pesca, molluschi bivalvi vivi e miele da paesi terzi;
- Metodi di analisi e prova per il latte crudo e il latte trattato termicamente;
- Metodo per la determinazione del tenore di tossine algali PSP (*Paralytic shellfish poison*) nei molluschi bivalvi.

Regolamento (CE) N. 1666/2006 della Commissione del 6 novembre 2006, recante modifica del regolamento CE n. 2076/2005 che fissa disposizioni transitorie per l'attuazione dei regolamenti del Parlamento europeo e del Consiglio (CE) n. 853/2004, (CE) n.854/2004 e (CE) n. 882/2004; tali modifiche riguardano:

- Importazione di olio di pesce da Paesi terzi;
- Importazione di cosce di rana, gelatina e collagene da Paesi terzi;
- Elenco dei Paesi terzi da cui è possibile importare prodotti della pesca, molluschi bivalvi, echinodermi, tunicati e gasteropodi marini.

Direttiva 2006/88/CE del Consiglio del 24 ottobre 2006 relativa alle condizioni di polizia sanitaria applicabili alle specie animali d'acquacoltura e ai relativi prodotti, nonché alla prevenzione di alcune malattie degli animali acquatici e alle misure di lotta contro talune malattie.

Regolamento (CE) N. 1441/ 2007 della Commissione del 5 dicembre 2007, che modifica il regolamento (CE) n. 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari;

Decreto Legislativo n. 193/2007 del 6 novembre 2007, “*Attuazione della direttiva 2004/41/CE relativa ai controlli in materia di sicurezza alimentare e applicazione dei regolamenti comunitari nel medesimo settore*”; questo decreto integra pienamente il pacchetto igiene nell'ordinamento italiano.

Regolamento (CE) N. 1019/2008 della Commissione del 17 ottobre 2008 che modifica l'allegato II del regolamento (CE) n. 852/2004 del parlamento europeo e del Consiglio sull'igiene dei prodotti alimentari; tali modifiche riguardano l'ammissione dell'uso di acqua pulita per prodotti della pesca, molluschi bivalvi vivi, tunicati e gasteropodi.

Regolamento (CE) N. 1020/2008 della Commissione del 17 ottobre 2008 che modifica gli allegati II e III del regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale e il regolamento (CE) n. 2076/2005 per quanto riguarda la marchiatura d'identificazione, il latte crudo e i prodotti lattiero-caseari, le uova e gli ovoprodotti e taluni prodotti della pesca; tali modifiche riguardano:

- Ammissione dell'uso di acqua pulita per i prodotti della pesca;
- Cottura di crostacei e molluschi;
- Preparazione dell'olio di pesce;
- Valori di carica batterica nel latte vaccino crudo;
- Marchiatura delle uova.

Regolamento (CE) N. 1021/2008 della Commissione del 17 ottobre 2008 che modifica gli allegati I, II e III del regolamento (CE) n.854/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione dei controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano e il regolamento (CE) n. 2076/2005 per quanto riguarda i molluschi bivalvi vivi, taluni prodotti della pesca e il personale assistente durante i controlli ufficiali nei macelli; tali modifiche riguardano:

- Bollatura sanitaria;
- Incarichi per il personale dei macelli;
- Classificazione delle zone di produzione dei molluschi bivalvi (sono sostituite quelle introdotte dal Regolamento CE n.1666/2006).
- Regole per l'immissione sul mercato di prodotti della pesca nelle cui carni si trovano tossine.

Regolamento (CE) N. 1022/2008 della Commissione del 17 ottobre 2008 recante modifica del regolamento (CE) n. 2074/2005 per quanto riguarda i valori limite di azoto basico volatile totale (ABVT) nei prodotti della pesca;

Regolamento (CE) N. 1250/2008 della Commissione del 12 dicembre 2008 che modifica il regolamento (CE) n. 2074/2005 per quanto riguarda le condizioni di certificazione per le importazioni dei prodotti della pesca, molluschi bivalvi vivi, echinodermi, tunicati e gasteropodi marini destinati al consumo umano; queste modifiche annullano quelle introdotte dal regolamento CE n. 1664/2006.

Regolamento (CE) N. 1251/2008 della Commissione del 12 dicembre 2008 recante modalità di esecuzione della direttiva 2006/88/CE per quanto riguarda le condizioni e le certificazioni necessarie per l'immissione sul mercato e l'importazione nella Comunità di

animali d'acquacoltura e i relativi prodotti e che stabilisce un elenco di specie vettrici.

Regolamento (CE) N. 1162/2009 della Commissione del 30 novembre 2009 che fissa disposizioni transitorie per l'attuazione dei regolamenti del parlamento europeo e del Consiglio (CE) n. 853/2004, (CE) n. 854/2004 e (CE) n. 882/2004; Viene cioè fissato un periodo transitorio di quattro anni, fino al 31 dicembre 2013, per l'attuazione dei Regolamenti (CE) n. 853/2004, (CE) n. 854/2004 e (CE) n. 882/2004.

Regolamento (UE) N. 809/2011 della Commissione dell'11 agosto 2011 che modifica il regolamento (CE) n. 2074/2005 per quanto riguarda la documentazione di accompagnamento di prodotti della pesca congelati importati direttamente da una nave frigorifero.

Regolamento (UE) N. 16/2012 della Commissione dell'11 gennaio 2012 che modifica l'allegato II del regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda i requisiti relativi agli alimenti congelati di origine animale destinati al consumo umano; il regolamento definisce la "*data di produzione*" intendendo:

- La data di macellazione (per carcasse, mezzene e quarti di carcasse);
- La data di uccisione (per la selvaggina);
- La data di raccolta o di pesca (per i prodotti ittici);
- La data di trasformazione, taglio, o tritatura o preparazione (per gli altri alimenti animali)

Inoltre, prima dell'etichettatura degli alimenti (come da Direttiva 2000/13/CE) o di ulteriori trasformazioni, gli operatori del settore alimentare devono garantire che gli alimenti animali congelati riportino, a uso dell'operatore del settore alimentare a cui vengono forniti e su richiesta dell'Autorità competente, la data di produzione e la data di congelamento (se diversa da quella di produzione). Se un alimento è prodotto a partire da una partita di materie prime con diverse date di produzione e congelamento, devono essere rese note le date di produzione e/o congelamento meno recenti, a seconda dei casi. La scelta della forma in cui riportare tali informazioni è a discrezione del fornitore degli alimenti congelati, purchè le informazioni siano chiaramente ed inequivocabilmente rese disponibili, e siano rintracciabili.

Regolamento (UE) N. 1012/2012 della Commissione del 5 novembre 2012 che modifica il regolamento (CE) n. 2074/2005 e il regolamento (CE) n. 1251/2008 per quanto riguarda l'elenco delle specie vettrici, le condizioni di polizia sanitaria e le condizioni di certificazione concernenti la sindrome ulcerativa epizootica e per quanto riguarda l'inserimento della Thailandia nell'elenco dei paesi terzi dai quali sono autorizzate le importazioni di determinati pesci e prodotti della pesca verso l'Unione.

3.3 L'ETICHETTATURA DEI PRODOTTI ALIMENTARI A LIVELLO COMUNITARIO

Le crescenti esigenze dei consumatori in materia di sicurezza alimentare, trasparenza e rintracciabilità dei prodotti, si sono tradotte nella necessità, a livello europeo, di armonizzare le norme relative all'etichettatura, attraverso l'attuazione di severe regolamentazioni comunitarie specifiche e settoriali. L'etichettatura di un prodotto alimentare ha infatti un ruolo fortemente strategico, in quanto rappresenta una sorta di carta d'identità del prodotto, un ponte tra produttore e consumatore, e per questa sua funzione deve pertanto essere redatta in modo chiaro ed esaustivo, oltre che veritiero. Le principali finalità dell'etichettatura sono, oltre a fornire una corretta informazione sulle caratteristiche del prodotto, anche quelle di non indurre in inganno il consumatore su caratteristiche e/o proprietà che il prodotto non possiede, permettere di valutare correttamente il rapporto tra la qualità del prodotto e il prezzo di vendita, garantire la correttezza delle operazioni commerciali e la libera circolazione dei prodotti alimentari sui mercati comunitari e internazionali, ed infine promuovere commercialmente il prodotto stesso. I termini chiave della Legislazione comunitaria in tema di etichettatura sono stati riportati in tabella 3.4.

Etichettatura
<i>“insieme delle menzioni, delle indicazioni, dei marchi di fabbrica o di commercio, delle immagini o dei simboli che si riferiscono al prodotto alimentare e che figurano direttamente sull'imballaggio o su un'etichetta appostavi o sul dispositivo di chiusura o su carrelli, anelli o fascette legati al prodotto medesimo o, in mancanza, in conformità a quanto stabilito negli artt. 14, 16 e 17, sui documenti di accompagnamento del prodotto alimentare ” (D. Lgs. 109/92).</i>
Etichettatura nutrizionale
<i>“dichiarazione riportata sull'etichetta e relativa al valore energetico ed ai seguenti nutrienti: le proteine, i carboidrati, i grassi, le fibre alimentari, il sodio, le vitamine e i Sali minerali elencati nell'allegato e presenti in quantità non inferiore al 15% della RDA” (D. Lgs. 77/1993).</i>
Denominazione di vendita
<i>“nome del prodotto che deve corrispondere a quello prescritto dalla normativa nazionale o comunitaria ad esso applicabile oppure, in mancanza di esso, il nome consacrato da usi e consuetudini” (D. Lgs 109/92).</i>
Indicazione
<i>“qualunque messaggio o rappresentazione in base alla legislazione comunitaria o nazionale, comprese le rappresentazioni figurative, grafiche o simboliche in qualsiasi forma, che affermi, suggerisca o sottintenda che un alimento abbia particolari caratteristiche” (Reg. CE n. 1924/2006).</i>
Informazione/ Indicazione nutrizionale
<i>“una descrizione e un messaggio pubblicitario che affermi, suggerisca o richiami che un alimento possiede particolari caratteristiche nutrizionali inerenti: a) al valore energetico che esso fornisce, o fornisce a tasso ridotto, o maggiorato o che non fornisce; b) ai nutrimenti che esso contiene o contiene in proporzione ridotta o maggiorata ovvero non contiene ” (D. Lgs. 77/1993 – Reg. CE n. 1924/2006).</i>
Indicazione sulla salute

<i>“qualunque indicazione che affermi, suggerisca o sottintenda l'esistenza di un rapporto tra una categoria di alimenti, un alimento o uno dei suoi componenti e la salute” (Reg. CE n. 1924/2006).</i>
Indicazione relativa alla riduzione di un rischio di malattia
<i>“qualunque indicazione che affermi, suggerisca o sottintenda che il consumo di una categoria di alimenti, di un alimento o di uno dei suoi componenti riduce significativamente un fattore di rischio di sviluppo di una malattia umana” (Reg. CE n. 1924/2006).</i>
Ingrediente
<i>“qualsiasi sostanza, compresi gli additivi, utilizzata nella preparazione e produzione degli alimenti e presente nel prodotto finito anche se modificata” (D. Lgs. 109/92).</i>
Lotto
<i>“insieme delle unità di vendita di un prodotto alimentare fabbricate o confezionate in circostanze identiche; il lotto presuppone la presenza di più unità di vendita e non di un singolo prodotto a se stante” (D. Lgs. 109/92).</i>
Termine minimo di conservazione
<i>“è la data fino alla quale il prodotto alimentare conserva le sue proprietà specifiche in adeguate condizioni di conservazione; esso va indicato con la dicitura “da consumarsi preferibilmente entro” seguita dalla data oppure dalla indicazione del punto della confezione in cui essa figura” (D. Lgs. 109/92).</i>
Data di scadenza
<i>“è la data entro la quale il prodotto alimentare va consumato; essa va indicata con la dicitura “da consumarsi entro” seguita dalla data oppure dalla indicazione del punto della confezione in cui essa figura” (D. Lgs. 109/92).</i>
Titolo alcolometrico volumico
<i>“è il numero di parti di volume di alcool puro alla temperatura di 20°C contenuto in 100 parti in volume del prodotto considerato a quella temperatura” (D. Lgs. 109/92).</i>
Unità di vendita
<i>“unità destinata come tale al consumatore e sulla quale devono essere riportate le indicazioni dell'etichetta. L'unità di vendita può essere il singolo preimballaggio o l'imballaggio contenente due o più preimballaggi” (D. Lgs. 109/92).</i>

Tab. 3.4: Principali termini e definizioni in tema di etichettatura. D.Lgs. 109/92 – Reg. Ce n. 1924/2006

L'Unione Europea ha disciplinato per la prima volta l'etichettatura degli alimenti con l'emanazione della **Direttiva 79/112/CEE** del 18 dicembre 1978. Questa Direttiva è stata recepita in Italia con il **Decreto Legislativo n. 109/92** del 27 gennaio 1992, il quale ha abrogato *“tutte le disposizioni in materia di etichettatura, di presentazione e di pubblicità dei prodotti alimentari e relative modalità, diverse o incompatibili con quelle previste dal decreto, ad eccezione di quelle contenute nei regolamenti comunitari e nelle norme di attuazione di direttive comunitarie relative a singole categorie di prodotti”* (D. Lgs. n. 109/92).

Questa norma è stata più volte modificata in seguito alla promulgazione di altri provvedimenti, tra i quali uno dei più importanti è la **Direttiva 2000/13/CE** del Parlamento europeo e del Consiglio del 20 marzo 2000 *“relativa al ravvicinamento delle legislazioni degli Stati Membri concernenti l'etichettatura e la presentazione dei prodotti alimentari destinati al consumatore finale, nonché la relativa pubblicità”*, recepita in Italia con il **Decreto Legislativo n. 181/2003** del 23 giugno 2003, che ha apportato una serie di

modifiche al Decreto Legislativo n. 109/92, pur confermandolo come legge quadro.

Le suddette normative disciplinano l'etichettatura dei prodotti sfusi, preincartati e preconfezionati, le cui definizioni sono riportate in tabella 3.5.

Prodotti sfusi
<i>“tutti quei prodotti alimentari sui quali non è possibile apporre l'etichetta in quanto privi della confezione”.</i>
Prodotti preincartati
<i>“tutti quei prodotti alimentari confezionati sul luogo di vendita al momento della richiesta del cliente o antecedentemente ma ai fini della vendita immediata nello stesso locale dove sono stati confezionati”.</i>
Prodotti preconfezionati (o preimballati)
<i>“tutti quei prodotti alimentari confezionati in assenza dell'acquirente ed avvolti, totalmente o in parte, in un imballaggio che deve essere mantenuto integro fino al momento del consumo”.</i>

Tab. 3.5: Definizioni dei prodotti alimentari sfusi, preincartati o preconfezionati. D. Lgs. n. 109/92.

Secondo quanto stabilito dalle suddette norme (il principale riferimento normativo al riguardo è rappresentato dalla Direttiva 2000/13/CE e dal Decreto Legislativo n. 181/2003 e successive modifiche e integrazioni), sull'etichetta dei **prodotti preconfezionati** devono essere riportati:

1. il prezzo di vendita e il prezzo per unità di misura (art.4, **Direttiva 98/6/CE**);
2. la denominazione di vendita (è costituita dal nome d'uso e non può essere sostituita da un marchio);
3. l'elenco degli ingredienti in ordine decrescente di peso in rapporto al prodotto;
4. la quantità netta o la quantità nominale;
5. il termine minimo di conservazione (mediante la dicitura “da consumarsi preferibilmente entro”) o, nel caso di prodotti molto deperibili, la data di scadenza in modo leggibile e di facile individuazione (**Legge 40/2007**);
6. il nome o la ragione sociale o il marchio depositato e la sede o del fabbricante o del confezionatore o di un venditore stabilito nella Comunità europea;
7. la sede dello stabilimento di produzione o di confezionamento;
8. il titolo alcolometrico volumico effettivo per le bevande aventi un contenuto alcolico superiore a 1,2% in volume e che contengono determinati coloranti alimentari (**Regolamento CE n. 238/2010**);
9. una dicitura che consenta di identificare il lotto di appartenenza del prodotto;
10. le modalità di conservazione e di utilizzazione qualora sia necessaria l'adozione di particolari accorgimenti in funzione della natura del prodotto;
11. le istruzioni per l'uso, ove necessario;
12. il luogo di origine o di provenienza, nel caso in cui l'omissione possa indurre in errore l'acquirente circa l'origine o la provenienza del prodotto;
13. le quantità specifiche dell'ingrediente caratterizzante del prodotto espressa in percentuale sul prodotto stesso (art. 8, **D.Lgs. 109/92**);
14. l'elenco degli allergeni soggetti a obbligo di segnalazione (**Direttiva 2003/89/CE**);

15. l'elenco dei coloranti, conservanti, edulcoranti e additivi chimici (**Direttiva 2003/114/CE**) nei limiti di legge;
16. l'eventuale aggiunta di vitamine e minerali nei limiti di legge;
17. l'eventuale indicazione degli ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti (**Direttive 1999/2/CE e 1999/3/CE**);
18. l'indicazione "Organismi geneticamente modificati" per i prodotti che hanno un contenuto di OGM superiore allo 0,9%. Tutte le sostanze di origine OGM devono essere indicate nell'elenco degli ingredienti con la dicitura "geneticamente modificato";
19. il valore energetico medio nelle percentuali previste e gli elementi nutritivi nel caso in cui al prodotto sia associata un'indicazione nutrizionale;
20. le indicazioni specifiche previste per legge per determinate categorie di prodotto (prodotti alimentari destinati all'infanzia, prodotti adatti alle persone intolleranti al glutine, prodotti dietetici, integratori alimentari, prodotti biologici, prodotti Dop/Igp, ecc.).

Gli alimenti commercializzati sfusi o preincartati soggiacciono a regole di etichettatura meno restrittive rispetto a quelle dei prodotti preconfezionati, finalizzate a facilitare le operazioni di vendita garantendo, al contempo, l'informazione e la tutela del consumatore. Le indicazioni obbligatorie per questa categoria di prodotti sono:

1. Denominazione di vendita;
 2. Elencazione degli ingredienti, salvo i casi in cui il prodotto ne è esente.
- A queste vanno poi aggiunte:
- a) Per le paste fresche: la data di scadenza;
 - b) Per i prodotti ortofrutticoli: la varietà, l'origine e il calibro/categoria;
 - c) Per i prodotti della pesca: la tecnica di produzione (pescato/allevato) e la zona di origine;
 - d) Per le bevande contenenti alcool in quantità superiore a 1,2% in volume: il titolo alcolometrico volumico;
 - e) Per i prodotti particolarmente deperibili: le modalità di conservazione.

Tali informazioni devono essere apposte sul prodotto e/o sulla confezione che lo contiene e/o sul banco di vendita.

Anche la presentazione e la pubblicità devono essere tali da non indurre in inganno il consumatore, né devono essere menzionate proprietà medicamentose riferite a quel prodotto, a meno che non sia specificamente disciplinato ed autorizzato ai sensi del **Decreto Legislativo n. 111/92** del 17 febbraio 1992 "*Attuazione della direttiva 89/398/CEE concernente i prodotti alimentari destinati ad una alimentazione particolare*". Tutte le informazioni inoltre devono essere riportate in caratteri leggibili ed indelebili, intelligibili al consumatore, quindi opportunamente tradotte nelle diverse lingue. Sono state

inoltre emanate specifiche norme riguardo al contenuto in energia (in kilocalorie o in kilojoule) e nutrienti (proteine, carboidrati, grassi, fibra, vitamine e sali minerali) dei prodotti alimentari. Questa legislazione prende avvio dalla **Direttiva 90/496/CEE** del Consiglio del 24 settembre 1990 “*Relativa all’etichettatura nutrizionale dei prodotti alimentari*”, recepita in Italia con il **Decreto Legislativo n. 77/1993** del 16 febbraio 1993, e viene ripresa e ulteriormente ampliata nella già ricordata Direttiva 2000/13/CE.

Per venire incontro a specifiche problematiche connesse al consumo di determinati alimenti con possibili impatti sulla salute umana, nel 2003 è stata pubblicata la **Direttiva 2003/89/CE** del Parlamento europeo e del Consiglio del 10 novembre 2003 (c.d. direttiva allergeni) che, modificando la precedente Direttiva 2000/13/CE, introduce l’obbligo di menzione in etichetta di particolari ingredienti utilizzati nella preparazione degli alimenti. Questa Direttiva è stata recepita in Italia con il **Decreto Legislativo n. 114/2006** del 8 febbraio 2006 e successivamente dal **Decreto Legislativo n. 7/2007** del 31 gennaio 2007 “*Recante misure urgenti per la tutela dei consumatori, la promozione della concorrenza, lo sviluppo di attività economiche e la nascita di nuove imprese*”, a sua volta convertito con modificazioni con la **Legge n. 40/2007** del 2 aprile 2007. Questi Decreti legislativi disciplinano appunto l’indicazione degli ingredienti in etichetta e riportano l’elenco aggiornato di prodotti alimentari contenenti sostanze allergeniche.

La normativa sull’etichetta nutrizionale dei prodotti alimentari è stata ulteriormente aggiornata con l’introduzione del **Regolamento (CE) n. 1924/2006** del Parlamento europeo e del Consiglio del 20 dicembre 2006 “*Relativo alle indicazioni nutrizionali e sulla salute fornite dai prodotti alimentari*” (stabilisce quali sono le indicazioni nutrizionali che possono essere presenti in etichetta, nelle presentazioni e nella pubblicità, nonché i relativi requisiti; stabilisce inoltre i requisiti delle indicazioni relative ad effetti sulla salute, nonché alla riduzione del fattore di rischio di malattia, degli alimenti) e del **Regolamento (CE) n. 1925/2006** del Parlamento europeo e del Consiglio del 20 dicembre 2006 “*Sull’aggiunta di vitamine e minerali e di talune sostanze negli alimenti*”. Ad integrare i suddetti regolamenti, dal 14 dicembre 2012 è in vigore il **Regolamento (UE) n. 432/2012** della Commissione del 16 maggio 2012 “*Relativo alla compilazione di un elenco di indicazioni sulla salute consentite sui prodotti alimentari, diverse da quelle facenti riferimento alla riduzione dei rischi di malattia e allo sviluppo e alla salute dei bambini*”.

Il 22 novembre 2011 è stato pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale dell’Unione Europea il **Regolamento (UE) n. 1169/2011** del Parlamento europeo e del Consiglio del 25 ottobre 2011 “*Relativo alla fornitura di informazioni sugli alimenti ai consumatori, che modifica i regolamenti (CE) n. 1924/2006 e (CE) n. 1925/2006 del Parlamento europeo e del*

Consiglio e abroga la direttiva 87/250/CEE della Commissione, la direttiva 90/496/CEE del Consiglio, la direttiva 1999/10/CE della Commissione, la direttiva 2000/13/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, le direttive 2002/67/CE e 2008/5/CE della Commissione e il regolamento (CE) n. 608/2004 della Commissione”, che ridefinisce la normativa relativa all’etichettatura dei prodotti alimentari.

Come stabilito all’art. 55 dello stesso regolamento, il provvedimento si applica a decorrere dal 13 dicembre 2014, ad eccezione di:

- ✓ Art. 9, par. 1, lett. 1) (obbligo di dichiarazione nutrizionale) che si applica a decorrere dal 13 dicembre 2016;
- ✓ Allegato VI, parte B (requisiti specifici relativi alla designazione delle “carni macinate”) che si applica a decorrere dal 1 gennaio 2014.

Gli Stati Membri dell’Unione Europea dovranno dunque allinearsi al Regolamento (UE) n. 1169/2011 entro le date di applicazione previste dal regolamento stesso.

Esso rappresenta un atto normativo complesso, che riassorbe le diverse e stratificate fonti normative passate in materia di etichettatura nutrizionale e salutistica, allergeni ed indicazioni volontarie ed obbligatorie in etichetta (www.sicurezzaalimentare.it).

Di seguito le principali novità previste dalla nuova normativa comunitaria:

- **Responsabilità:** chi appone il proprio nome o ragione sociale o marchio sull’alimento destinato al consumatore finale, sia esso il produttore o il venditore, è responsabile della completezza e veridicità delle informazioni riportate in etichetta; per i prodotti che provengono dai Paesi extracomunitari il responsabile è l’importatore; è esclusa la possibilità di utilizzo di marchi registrati.
- **Obbligo delle tabelle nutrizionali:** gli alimenti confezionati devono avere una tabella nutrizionale con sette elementi (contenuto energetico, grassi, acidi grassi saturi, carboidrati, proteine, zuccheri, sale) riferiti a 100 g o 100 ml di prodotto ma anche riferiti alle singole porzioni con la possibilità di indicare le percentuali giornaliere raccomandate o indicative (GDA).
- **Leggibilità dell’etichetta:** per rendere più facilmente leggibili le indicazioni obbligatorie dovranno essere appose in un punto evidente dell’etichetta, facilmente visibili e leggibili e non confuse con altre scritte o elementi grafici; inoltre è stata fissata la dimensione minima nelle diciture obbligatorie che dovranno avere caratteri tipografici minimi stabiliti.
- **Posizionamento delle indicazioni obbligatorie:** Le diciture obbligatorie, le

indicazioni nutrizionali e quelle relative all'origine devono essere nello stesso campo visivo della denominazione di vendita.

- **Luogo di origine (luogo dove il prodotto ha subito l'ultima sostanziale trasformazione):** se viene indicata l'origine del prodotto e questa è diversa da quella dell'ingrediente primario che lo costituisce, andrà indicata l'origine anche di quest'ultimo. Diventa obbligatorio indicare il Paese d'origine o il luogo di provenienza per la carne suina, ovina, caprina e il pollame, fresca o congelata, venduta tal quale.
- **Allergeni:** devono essere evidenziati nella lista degli ingredienti, anche se presenti in tracce o in forma residuale, in corrispondenza di ogni ingrediente che li contiene e devono essere evidenziati rispetto al resto del testo utilizzato.
- **Data di scadenza:** deve essere riportata anche sulle confezioni preconfezionate all'interno del prodotto.
- **Prodotti scongelati:** un alimento congelato o surgelato venduto scongelato deve riportare sull'etichetta la parola "scongelato". Inoltre è fatto obbligo di indicare per la carne, le preparazioni a base di carne e i prodotti non trasformati a base di pesce che sono stati congelati la data del congelamento.

CAPITOLO 4

NORMATIVA COMUNITARIA PER I PRODOTTI DELLA PESCA

I regolamenti comunitari in materia igienico sanitaria che costituiscono il “*Pacchetto igiene*” hanno introdotto, come discusso nel Capitolo 4, importanti cambiamenti rispetto alla legislazione precedente; quest’ultima, caratterizzata da norme di tipo verticale, ciascuna delle quali stabiliva disposizioni relative ad una sola tipologia di prodotto, è stata infatti sostituita dai nuovi Regolamenti comunitari, con lo scopo di raggruppare la complessa argomentazione di tutta la normativa alimentare e di garantire la sicurezza degli alimenti dal luogo di produzione primaria al punto di commercializzazione o esportazione sotto una dimensione integrata (Pagliarulo, 2006). I Regolamenti (CE) n. 178/2002, (CE) 852/2004, (CE) 853/2004, (CE) 854/2004 e (CE) 882/2004 hanno costituito il punto di partenza della nuova legislazione alimentare, e sono stati poi opportunamente modificati ed integrati con altre normative emanate successivamente; si tratta di norme, strettamente interconnesse tra loro, di tipo orizzontale, che abbracciano trasversalmente tutte le produzioni alimentari e, tra queste, anche il comparto ittico. Una prima grande differenza tra nuova e vecchia normativa si riscontra proprio nell’estensione del controllo igienico-sanitario anche alla produzione primaria che, nell’ambito dei prodotti della pesca, viene definita come “*allevamento, pesca, raccolta dei prodotti vivi della pesca in vista dell’immissione sul mercato, operazioni connesse se svolte a bordo di navi da pesca (macellazione, dissanguamento, decapitazione, eviscerazione, taglio pinne, refrigerazione e confezionamento) e trasporto e magazzinaggio di prodotti vivi o la cui natura non sia stata alterata fino al primo stabilimento*” (Regolamento CE n. 853/2004). Per produzione primaria in relazione ai molluschi bivalvi vivi si intende invece “*la produzione, la raccolta e le operazioni connesse che hanno luogo prima che i molluschi bivalvi vivi arrivino ad un centro di spedizione o ad un centro di depurazione o a uno stabilimento di trasformazione*” (Regolamento CE n. 853/2004). Il pescatore diventa dunque a tutti gli effetti operatore del settore alimentare e i prodotti, se destinati al consumo umano, diventano alimenti dal momento della raccolta (AA.VV. *Manuale per buona prassi igienica per la produzione primaria-attività di pesca*, 2009). Quindi, gli operatori della pesca e della molluschicoltura che effettuano la produzione primaria e le attività connesse sono tenuti a rispettare sia i requisiti generali di igiene dell’Allegato I del Regolamento (CE) n. 852/2004 che i requisiti

specifici di igiene dell'Allegato III, sezione VII e VIII del Regolamento (CE) n. 853/2004 (*Tabella y*).

I principi del sistema HACCP non sono ancora applicabili su base generalizzata alla produzione primaria; pertanto gli operatori di tale settore possono ricorrere all'uso di manuali di corretta prassi igienica contenenti informazioni adeguate sui pericoli che possono insorgere e sulle azioni di controllo dei pericoli nella produzione primaria e nelle operazioni associate (Sellitto & Cacace, 2007). Il concetto di produzione primaria non veniva infatti citato dalla precedente **Direttiva n. 91/493/CEE** del Consiglio del 22 luglio 1991 "*Norme applicabili alla produzione e alla commercializzazione dei prodotti della pesca*", recepita in Italia mediante l'emanazione del **Decreto Legislativo n. 531/1992** del 30 dicembre 1992, che ha costituito il riferimento normativo del settore per quasi 15 anni, e che è stata abrogata dalla **Direttiva n. 2004/41/CE** del Parlamento europea e del Consiglio del 21 aprile 2004 "*che abroga alcune direttive recanti norme sull'igiene dei prodotti alimentari e le disposizioni sanitarie per la produzione e la commercializzazione di determinati prodotti di origine animale destinati al consumo umano e che modifica le direttive 89/662/CEE del Consiglio e 92/118/CEE e la decisione 95/408/CE del Consiglio*", a sua volta recepita a livello nazionale con il **Decreto Legislativo n. 193/2007** del 6 novembre 2007 (che ha integrato a pieno titolo il Pacchetto Igiene nell'ordinamento italiano). Un'altra significativa differenza risiede nella definizione stessa di prodotto della pesca; nella nuova normativa, tale definizione comprende sia i prodotti selvatici sia quelli allevati, mentre prima essi erano definiti separatamente. (*Tab. 4.1*)

Direttiva 91/493/CEE
Prodotti della pesca: <i>"tutti gli animali marini o di acqua dolce o parti di essi, comprese le loro uova e lattime, esclusi i mammiferi acquatici, le rane e gli altri animali oggetto di altri atti comunitari".</i>
Prodotti dell'acquacoltura: <i>"tutti i prodotti della pesca nati ed allevati in condizioni controllate dall'uomo fino al momento della loro commercializzazione come prodotti alimentari".</i>
Regolamento (CE) n. 853/2004
Prodotti della pesca: <i>"tutti gli animali marini e d'acqua dolce (ad eccezione dei molluschi bivalvi vivi, echinodermi vivi, tunicati vivi, gasteropodi marini vivi e di tutti i mammiferi, rettili e rane), selvatici o d'allevamento e tutte le forme, le parti e prodotti commestibili di tali animali".</i>

Tab. 4.1: Definizioni di "prodotto della pesca" nella Direttiva 91/493/CEE e nel Regolamento (CE) n. 853/2004.

Sostanzialmente invariati nell'ambito della vecchia e della nuova normativa sono invece le definizioni relative ai prodotti della pesca freschi, preparati e trasformati. Il Regolamento (CE) n. 853/2004 definisce:

Prodotti della pesca freschi: *“i prodotti della pesca non trasformati, interi o preparati, compresi i prodotti imballati sotto vuoto o in atmosfera modificata che, ai fini della conservazione, non hanno subito alcun trattamento diverso dalla refrigerazione, inteso a garantirne la conservazione”.*

Prodotti della pesca preparati: *“i prodotti della pesca non trasformati sottoposti ad una operazione che ne abbia modificato l'integrità anatomica, quali l'eviscerazione, la decapitazione, l'affettatura, la filettatura e la tritatura”.*

Prodotti della pesca trasformati: *“i prodotti trasformati risultanti dalla trasformazione di prodotti della pesca o dall'ulteriore trasformazione di detti prodotti trasformati”.*

L'Allegato III del Regolamento (CE) n. 853/2004 riporta, rispettivamente nelle sezioni VII e VIII, i requisiti per i molluschi bivalvi vivi e per i prodotti della pesca.

- *I prodotti della pesca mantenuti vivi devono essere mantenuti a una temperatura e in condizioni che non pregiudichino la sicurezza alimentare o la loro vitalità;*
- *I prodotti freschi non imballati devono essere conservati sotto ghiaccio (reimmesso ogniqualvolta sia necessario) in strutture adeguate, quelli imballati devono essere refrigerati a una temperatura che si avvicini a quella del ghiaccio fondente;*
- *Le operazioni di eviscerazione e taglio devono essere effettuate igienicamente, il più rapidamente possibile dopo la cattura o lo sbarco, con continui e accurati lavaggi con acqua potabile o, a bordo delle navi, con acqua pulita;*
- *I prodotti della pesca interi ed eviscerati possono essere trasportati e conservati in acqua refrigerata a bordo delle navi;*
- *Gli stabilimenti per la lavorazione e la conservazione di prodotti congelati devono disporre di installazioni con capacità frigorifera in grado di ridurre rapidamente la temperatura fino a una temperatura non superiore a -18°C al centro del prodotto, di mantenere i prodotti della pesca ad una temperatura non superiore a -18°C e disporre di strumenti per misurare e registrare la temperatura dei prodotti e dei locali;*

- *I prodotti della pesca congelati, eccetto i pesci congelati in salamoia destinati alla fabbricazione di conserve, devono essere mantenuti, durante il trasporto, a una temperatura stabile, non superiore a -18°C, in ogni parte della massa, con eventuali brevi fluttuazioni verso l'alto di 3°C al massimo.*
- *I vani carico nei quali i prodotti della pesca freschi sono conservati sotto ghiaccio devono essere costruiti con materiali impermeabili e garantire che l'acqua di fusione non rimanga a contatto con i prodotti;*
- *Quando i prodotti della pesca sono confezionati a bordo delle navi, gli operatori del settore alimentare devono garantire che il materiale di confezionamento non sia fonte di contaminazione, sia depositato in modo tale da non essere esposto al rischio di contaminazione, se destinato ad essere riutilizzato, sia facile da pulire e, se del caso, da disinfettare.*

In base allo stesso regolamento è possibile immettere sul mercato solo prodotti della pesca e molluschi bivalvi vivi preparati e/o manipolati in uno stabilimento riconosciuto dall'Autorità Competente. Gli stabilimenti soggetti a riconoscimento sono:

- ✓ Navi frigorifero e navi officina;
- ✓ Centri di depurazione e spedizione di molluschi bivalvi vivi;
- ✓ Stabilimenti operanti in regime di freddo artificiale che effettuano una o più delle seguenti operazioni: cernita, frazionamento, ghiacciatura e preparazione dei prodotti della pesca compresi i molluschi refrigerati, congelati o surgelati; depositi frigoriferi per la conservazione dei prodotti refrigerati e congelati;
- ✓ Stabilimenti di trasformazione che effettuano sterilizzazione, cottura, essiccazione, affumicamento, salagione, marinatura ecc.;
- ✓ Mercati all'ingrosso e aste in cui i prodotti della pesca vengono venduti;
- ✓ Stabilimenti frigorifero che producono carne di pesce separata meccanicamente;
- ✓ Stabilimenti che effettuano esclusivamente operazioni di riconfezionamento o associate ad altre operazioni di porzionatura, taglio ecc.

Viene inoltre introdotto anche l'obbligo del "marchio di identificazione" nei prodotti della pesca, che va a sostituire quello che nella maggior parte delle vecchie norme verticali era chiamato "bollo sanitario" o "contrassegno di identificazione". *"Il marchio deve e essere apposto o direttamente sul prodotto o sull'involucro o sull'imballaggio o essere stampato su una etichetta apposta a sua volta; il marchio può consistere anche in una targhetta inamovibile di materiale resistente" e "deve essere leggibile ed indelebile; i caratteri devono essere facilmente decifrabili; deve essere chiaramente esposto in modo da poter*

essere controllato”. Inoltre *“deve indicare il nome del Paese dove è situato lo stabilimento o per esteso o tramite le due lettere del codice ISO”* e *“il numero di riconoscimento dello stabilimento”* (Regolamento CE n. 853/2004).

4.1 LO STATO DI CONSERVAZIONE DEI PRODOTTI ITTICI

I prodotti della pesca hanno caratteristiche peculiari che li rendono più deperibili rispetto ad altri prodotti di origine animale in quanto:

- ✓ L'elevato tenore di acqua rende le carni più aggredibili da parte dei microrganismi e favorisce lo sviluppo di attività enzimatiche;
- ✓ L'elevata presenza di sostanze azotate di natura non proteica (ossido di trimetilammina, creatina, ammoniaca) ed amminoacidi liberi favoriscono la crescita dei batteri;
- ✓ La ridotta percentuale di glucosio determina una scarsa acidificazione delle carni dopo la morte che non impedisce la crescita batterica;
- ✓ La ridotta percentuale di tessuto connettivo consente ai batteri di penetrare nelle carni attraverso i muscoli fino in profondità.

Subito dopo la pesca, dunque, il prodotto ittico va incontro ad un rapido processo di deterioramento cui fa seguito un'imponente moltiplicazione microbica in grado di modificarne le caratteristiche e trasformarlo in un prodotto alimentare non più commestibile (AA.VV. *Manuale di buona prassi igienica per la produzione primaria*, 2009). La valutazione della freschezza di tali prodotti da parte degli operatori del settore risulta quindi indispensabile ed imprescindibile per quando riguarda non soltanto gli aspetti sanitari, ma anche per quelli commerciali (Eurofishmarket, Dossier). Il Pacchetto Igiene attribuisce una notevole importanza all'approccio sensoriale per l'accertamento della freschezza, o più precisamente dello stato di conservazione, dei prodotti ittici; in particolare, il Capitolo IV della sezione VIII del **Regolamento (CE) n. 853/2004** dispone che *“gli operatori del settore alimentare effettuino un esame organolettico per garantire che i prodotti della pesca soddisfino tutti i criteri di freschezza”*(Regolamento CE n. 853/2004). Allo stesso modo, l'Allegato III del **Regolamento (CE) n. 854/2004** prevede che i controlli ufficiali sui prodotti della pesca *“comprendano almeno controlli organolettici a campione effettuati in tutte le fasi di produzione, lavorazione e distribuzione, con lo scopo di verificare il rispetto dei criteri di freschezza, e quindi di verificare che i prodotti della pesca superino almeno i livelli minimi di criteri di freschezza stabiliti conformemente alla normativa comunitaria”* (Regolamento CE n. 854/2004).

L'esigenza di una valutazione di questo tipo fu espressa per la prima volta con il **Regolamento (CE) n. 103/76** del Consiglio del 19 gennaio 1976 *“che stabilisce norme comuni di commercializzazione per alcuni pesci freschi o refrigerati”* con il quale la Comunità Europea propose un modello di valutazione della freschezza basato su diversi parametri propri del prodotto (aspetto, colore, odore, pelle, branchie, occhio, carne, peritoneo, cavità addominale, organi, colonna vertebrale) e sull'attribuzione di un punteggio ad ogni singola caratteristica del pesce che permetteva di arrivare ad una classificazione, attraverso una media aritmetica, in una delle quattro classi di freschezza definite come “Extra”, “A”, “B” e “non ammesso”. Tale regolamento venne poi modificato in maniera sostanziale dal **Regolamento (CE) n. 33/89** del Consiglio del 5 gennaio 1989 che proponeva importanti innovazioni; tra queste:

- ✓ Era applicabile a 33 specie ittiche;
- ✓ Poteva essere applicato ai prodotti preparati (filetti, tranci ecc.);
- ✓ Superava il concetto di valutazione aritmetica per definire “criteri minimi di freschezza”;
- ✓ Nel giudizio finale era tenuta in considerazione anche la presenza di parassiti e la loro incidenza negativa sulla qualità del prodotto, creando di fatto una sorta di compromesso fra esigenze commerciali ed igienico-sanitarie (Bentley S.);
- ✓ Si considerava la presenza di elementi negativi che comportavano un deprezzamento del prodotto, come scorticature, segni di pressione, presenza di sudiciume ecc.

Si è arrivati poi all'emanazione del **Regolamento (CE) n. 2046/96** del Consiglio del 26 novembre 1996 *“che stabilisce norme comuni di commercializzazione per taluni prodotti della pesca”*, e successive modifiche (Fig 4.1)

- **Regolamento (CE) n. 323/97** della Commissione del 21 febbraio 1997;
- **Regolamento (CE) n. 2578/2000** del Consiglio del 17 novembre 2000;
- **Regolamento (CE) n. 2495/2001** della Commissione del 19 dicembre 2001;
- **Regolamento (CE) n. 790/2005** della Commissione del 25 maggio 2005.

Fig 4.1: Modifiche del Regolamento (CE) n. 2046/96

Nel Regolamento (CE) n. 2046/96 viene considerato un ampio numero di specie ittiche (37 specie di pesci, 2 di molluschi cefalopodi e 3 di crostacei) in relazione al fatto che la

deteriorabilità dei prodotti della pesca è considerevolmente influenzata da molteplici fattori di tipo biochimico, metabolico e nutrizionale legati appunto alla specie. Esse sono suddivise in gruppi definiti come “pesce bianco”, “pesce azzurro”, “selaci”, “cefalopodi” e “crostacei”, per ognuno dei quali viene proposto uno specifico schema di valutazione; per i primi tre sono previsti quattro tipi di classificazione (“Extra”, “A”, “B” e “non ammesso”), per i cefalopodi e crostacei i criteri sono solamente tre, non essendo stata inserita la categoria “non ammesso”. I parametri di valutazione sono relativi all’aspetto, all’odore, alle branchie, all’occhio, alla pelle, alla carne, agli opercoli, al peritoneo, ai vasi sanguigni e al muco (Regolamento CE n. 2046/96). Viene inoltre introdotto il concetto di omogeneità della partita, che costituisce un importante elemento di semplificazione ai fini della valutazione; una disomogeneità nello stato di freschezza penalizza di fatto l’intera partita, traducendosi di fatto in un immediato deprezzamento di tutto il gruppo, che viene classificato interamente nella più bassa categoria rappresentata (EuroFishMarket La freschezza del pesce: come valutarla, dossier). L’omogeneità della partita viene quindi considerata l’elemento determinante per la classificazione della categoria di freschezza (Chiappini, 2003).

Per un’ulteriore valutazione della freschezza dei prodotti della pesca si può anche ricorrere, senza tuttavia prescindere dalla suddetta valutazione sensoriale, a metodi fisici, chimici e microbiologici. I primi si basano sulla misurazione della conducibilità elettrica muscolare utilizzando apposite apparecchiature quali il Fish-Tester VI, il GR-Tottymeter e il Rt-freshmeter; i secondi sono specificatamente contemplati nella sezione VIII dell’allegato III del Regolamento (CE) n. 853/2004, laddove si prescrive che *“gli operatori del settore alimentare debbano garantire che i limiti relativi all’istamina non siano superati”* (Regolamento CE n. 853/2004) e che *“i prodotti della pesca non trasformati non siano immessi sul mercato se le analisi chimiche rivelino che i limiti relativi all’ABTV (Azoto basico volatile totale) o al TMA-N (Trimetilamina-N) siano superati”* (Regolamento CE n. 853/2004). L’Azoto Basico Totale Volatile (ABTV) si forma dalla degradazione dei composti azotati ad opera di enzimi tissutali e batterici per azione dei quali si sviluppano ammoniaca ed ammine volatili. L’ABTV può esprimere realtà biochimiche e batteriologiche differenti (ammine diverse, microrganismi diversi) responsabili di alterazioni organolettiche e della varietà di odori che si riscontrano nel pesce in via di decomposizione. Il **Regolamento (CE) n. 1022/2008** della Commissione del 17 ottobre 2008, modificando il Regolamento (CE) n. 2074/2005 fissa appunto i valori limite di Azoto Basico Totale volatile negli alimenti e fornisce dettagliate indicazioni relativamente ai metodi di riferimento per la determinazione della concentrazione. La Trimetilamina-N

(TMA-N) deriva dall'Ossido di trimetilammina attraverso la riduzione operata da enzimi prodotti da alcuni batteri presenti nei visceri e sulla superficie esterna dei pesci; dopo la cattura, il tenore di TMA-N aumenta costantemente con il protrarsi del tempo di conservazione e ad essa è da imputare il caratteristico "odore di pesce" che compare allorchè vengono raggiunti livelli compresi fra 4 e 6 mg/100g. Quantitativi superiori ai 10mg/100g conferiscono al pesce un odore tipico di prodotto stantio o alterato.

I criteri microbiologici si basano sugli studi della microflora microbica presente sul pesce (soprattutto in corrispondenza della superficie della cute e del muco superficiale, delle branchie e dell'intestino) la quale influisce incisivamente sullo scadimento qualitativo del prodotto determinandone il deterioramento.

4.2 PERICOLI ALIMENTARI DEI PRODOTTI DELLA PESCA: IDONEITÀ AL CONSUMO UMANO

Secondo il Regolamento (CE) n. 854/2004, i prodotti della pesca sono dichiarati non idonei al consumo umano se:

- In seguito a controlli organolettici, chimici, fisici o microbiologici o a controlli relativi alla presenza di parassiti, si rilevano non conformi alla pertinente normativa comunitaria;
- Contengono, nelle loro parti commestibili, contaminanti o residui che superano i limiti previsti dalla normativa comunitaria o in quantità tali che l'assorbimento alimentare calcolato sia superiore alla dose giornaliera o settimanale ammissibile per l'uomo;
- Derivano da pesci velenosi: prodotti della pesca non conformi ai requisiti in merito alle biotossine, molluschi bivalvi, echinodermi, tunicati o gasteropodi marini che contengono biotossine in quantità che superano i limiti previsti;
- L'Autorità competente ritiene che essi possano rappresentare un rischio per la salute pubblica o degli animali o che, per qualsiasi motivo, non siano idonei al consumo umano.

4.2.1 Pericoli chimici

I limiti per il contenuto di alcuni contaminanti chimici (mercurio, cadmio, piombo, diossine, idrocarburi policiclici aromatici) nei prodotti ittici e le relative modalità di determinazione sono fissati dal **Regolamento (CE) n. 1831/2003** della Commissione del 19 dicembre 2006 che *"definisce i tenori massimi di taluni contaminanti presenti nei"*

prodotti alimentari” e successive modifiche. Tali sostanze possono essere già presenti nell’ambiente acquatico (da fonti naturali o antropiche) oppure contaminare successivamente il prodotto (AA.VV. *Manuale di buona prassi igienica per la produzione primaria*, 2009). I metalli pesanti quali mercurio, cadmio e piombo possono destare preoccupazioni per il consumatore in virtù della loro capacità di bioaccumulare e biomagnificare lungo la catena trofica (Di Domenico *et al.*, 2003) fino a raggiungere nei pesci predatori più grandi i più elevati livelli di contaminazione (Storelli *et al.*, 2005). La tossicità dei metalli pesanti nell’uomo si manifesta soprattutto a carico di rene, fegato e sistema nervoso; in particolare, il metilmercurio, derivato dalla trasformazione del mercurio in ambiente marino ad opera di microrganismi negli strati superficiali dei sedimenti, se assunto da donne durante il periodo della gravidanza compromette in maniera irreversibile lo sviluppo del sistema nervoso del feto (Counter & Buchanan, 2004; Kim *et al.*, 2006). A seguito di una richiesta della Commissione, è stato chiesto al gruppo di esperti scientifici sugli additivi alimentari, gli aromatizzanti, i coadiuvanti tecnologici e i materiali a contatto con gli alimenti (gruppo di esperti AFC) anche un parere scientifico sulla sicurezza dell’**alluminio** contenuto in tutte le fonti di assunzione alimentare (EFSA, 2008).

Le **diossine** derivano dai processi di combustione non controllata provenienti da attività antropiche (incenerimento dei rifiuti, produzione di plastiche, scarichi dei veicoli di trasporto ecc.) e si liberano nell’ambiente contaminando il suolo e le acque e penetrando nella catena alimentare (AA.VV. *Manuale di buona prassi igienica per la produzione primaria*, 2009). Il tenore massimo di **Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)** è invece fissato dal più recente **Regolamento (UE) n. 835/2011** della Commissione del 19 agosto 2011 “*che modifica il regolamento (CE) n. 1881/2006 per quanto riguarda i tenori massimi di idrocarburi policiclici aromatici nei prodotti alimentari*”. Si tratta di composti organici che si formano nel corso della combustione incompleta di materia organica nel corso di vari processi industriali causando un inquinamento dell’ambiente che può contaminare i prodotti alimentari, inclusi quelli della pesca e i molluschi. Gli alimenti possono essere contaminati anche nel corso di processi non direttamente legati alla produzione primaria, quali affumicatura, riscaldamento o essiccazione, a causa del loro contatto diretto tra l’alimento e i prodotti della combustione (AA.VV. *Manuale di buona prassi igienica per la produzione primaria*, 2009). Nell’ultimo decennio gli IPA sono stati valutati nel contesto dell’IPCS (programma internazionale sulla sicurezza chimica), dal Comitato scientifico dell’alimentazione umana (SCF) e dal Comitato misto FAO/OMS di esperti per gli additivi alimentari (JECFA) e sono stati considerati potenzialmente

genotossici e cancerogeni per l'uomo e quindi da considerare nella valutazione del rischio di effetti avversi a lungo termine per la salute a seguito della loro assunzione tramite l'alimentazione (Richiesta n. EFSA-Q-2007-136, 2008).

4.2.2 Pericoli biologici

I criteri microbiologici sono stabiliti dal **Regolamento (CE) n. 2073/2005** della Commissione del 15 novembre 2005 “*sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari*” e successive modifiche. In appendice al regolamento sono riportate le tabelle dei criteri di sicurezza e igiene per le varie categorie di prodotti tra cui quelli ittici; esse riportano il microrganismo di riferimento, il piano di campionamento, i limiti, il metodo di analisi, la fase del processo a cui si applica e le misure in caso di risultati insoddisfacenti. Il regolamento cita quali principali microrganismi presenti nei prodotti della pesca e nei molluschi bivalvi potenzialmente causa di patologie nell'uomo batteri (*Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio spp.*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) e loro metaboliti/tossine e virus (*Virus dell'epatite A- HAV e Norovirus*). Inoltre fissa i limiti relativi all'istamina, un'ammina endogena derivante dalla decarbossilazione dell'istidina, particolarmente abbondante nelle famiglie di Scombroidei (sgombero, tonno, lanzardo, palamita ecc.) e, in misura minore, nei Clupeidi (sardine, acciughe ecc.) che può causare severe intossicazioni con disturbi gastrointestinali, nausea, cefalea, vertigini e reazioni cutanee (AA.VV. *Manuale di buona prassi igienica per la produzione primaria*, 2009). Accorgimento fondamentale nella gestione del rischio microbiologico da parte degli operatori del settore alimentare è quello di prestare la massima attenzione alla temperatura di conservazione del pescato e al mantenimento della catena del freddo, al fine di determinare un netto rallentamento della moltiplicazione batterica e sfavorire la produzione di istamina (Regolamento CE n. 2073/2005).

Il mantenimento della catena del freddo è fondamentale anche nella gestione dei parassiti; eseguire tempestivamente la refrigerazione e la ghiacciatura del prodotto (in seguito all'eviscerazione) ostacola infatti la migrazione delle larve di nematodi nelle carni. Il **Regolamento (CE) n. 853/2004** prescrive il congelamento a una temperatura non superiore a -20°C in ogni parte della massa per almeno 24 ore dei seguenti prodotti:

- ✓ Prodotti della pesca che vanno consumati crudi o praticamente crudi;
- ✓ Aringhe, sgombri, spratti, salmone (selvatico) dell'Atlantico e del Pacifico, se devono essere sottoposti a un processo di affumicatura a freddo (< 60°C);
- ✓ Prodotti della pesca marinati e/o salati se il trattamento praticato non garantisce la distruzione delle larve di nematodi.

Gli operatori del settore alimentare devono inoltre garantire che non siano superati i limiti relativi alle biotossine algali, riportati nel Regolamento (CE) n. 853/2004, per le quali la misura di prevenzione più efficace per impedire di inserire sul mercato prodotti contaminati è quella del monitoraggio delle zone di produzione, effettuato dalle Autorità di controllo e dagli stessi produttori. Le biotossine algali sono infatti sostanze organiche con azione tossica prodotte da microrganismi vegetali marini (fitoplancton) i quali si accumulano soprattutto nei molluschi filtratori; i danni nell'uomo dipendono dalla natura delle tossine stesse e dalla quantità di alimento ingerito e si possono manifestare malattie quali avvelenamento neuromotorio (PSP, *Paralytic Shellfish Poisoning*), gastro-enterico (DSP, *Diarrhetic Shellfish Poisoning*) ed avvelenamento definito "amnesico" (ASP, *Amnesic Shellfish Poisoning*) (AA.VV. *Manuale di buona prassi igienica per la produzione primaria*, 2009).

Riguardo ai prodotti della pesca velenosi, sempre secondo il Regolamento (CE) n. 853/2004, modificato dal **Regolamento (CE) n. 2074/2005** della Commissione del 5 dicembre 2005, non devono essere immessi sul mercato quei prodotti ottenuti da pesci velenosi appartenenti alle seguenti famiglie: *Tedraodontidae*, *Molidae*, *Diodontidae*, *Canthicasteridae*. I prodotti della pesca appartenenti alla famiglia *Gempylidae*, in particolare *Ruvettus preziosus* e *Lepidocybium flavobrunneum*, possono essere immessi sul mercato solo in forma di prodotti confezionati o imballati opportunamente etichettati al fine di informare il consumatore sulle modalità di preparazione o cottura e sul rischio connesso alla presenza di sostanze con effetti gastrointestinali avversi. E' in questo caso obbligatorio il nome scientifico sull'etichetta (Regolamento CE n. 853/2004).

4.3. ETICHETTATURA E TRACCIABILITÀ DEI PRODOTTI ITTICI

La legislazione sull'etichettatura dei prodotti alimentari ha le basi nelle Direttive 89/395/CEE e 89/396/CEE, diventate leggi nazionali con il Decreto Legislativo 109/1992 e successivi (vedi Capitolo 4) che riunisce gli adempimenti di carattere generale del comparto, e nel successivo Pacchetto Igiene ed in particolare le norme dei Regolamenti (CE) n. 853/2004 e (CE) n. 854/2004. Per la normativa più precisamente riferita all'etichettatura dei prodotti ittici si deve invece fare riferimento al più recente **Regolamento (CE) n. 104/2000** del Consiglio del 17 dicembre 1999 "*relativo all'organizzazione comune dei mercati nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura*" ed il suo attuativo **Regolamento (CE) n. 2065/2001** della Commissione del 22 ottobre 2001, recepiti in Italia con **Decreto MIPAF (Ministero delle Politiche Agricole e Forestali) del 27 marzo 2002** "*Etichettatura dei prodotti ittici e*

sistema di controllo” e successivi. A questi si sono aggiunte le indicazioni dell’articolo 58 del **Regolamento (CE) n. 1224/2009** del Consiglio del 20 novembre 2009 e dell’articolo 68 del **Regolamento (CE) n. 404/2011** della Commissione dell’8 aprile 2011, sulla Politica Comune della Pesca. Secondo le ultime disposizioni, ogni partita di prodotto ittico deve essere accompagnata dalle seguenti diciture:

- a) Numero di identificazione di ogni partita;
- b) Numero di identificazione esterno (numero di matricola) e nome del peschereccio o nome dell’unità di produzione in acquacoltura;
- c) Codice FAO alfa 3 di ogni specie;
- d) Data delle catture o data di produzione;
- e) Quantitativi di ciascuna specie in chilogrammi di peso netto o, se nel caso, numero di individui;
- f) Nome e indirizzo dei fornitori;
- g) Denominazione commerciale, denominazione scientifica, pertinente zona geografica e metodo di produzione;
- h) Se i prodotti della pesca siano stati precedentemente surgelati.

Nell’ottica di semplificare la valutazione da parte del consumatore, solo le informazioni ai punti g) e h) devono essere garantite anche al consumatore finale, con deroga per quanto riguarda la denominazione scientifica, nel caso in cui si affiggano nel punto vendita poster che mostrino adeguatamente la corrispondenza tra specie ittica e relativa **denominazione commerciale**. Riguardo a quest’ultima, è stato imposto agli Stati membri la stesura di una lista di denominazioni commerciali autorizzate, allo scopo di contenere le frodi rese possibili da una nomenclatura incerta, legata a tradizioni locali, che facilitava lo sfruttamento fraudolento in conseguenza alla somiglianza tra specie di differente pregio. In Italia i riferimenti normativi specifici sono rappresentati dagli elenchi ufficiali pubblicati con Decreti MIPAF che, nel corso degli anni, hanno modificato quello del 27 marzo 2002 riportante l’elenco delle denominazioni in lingua italiana delle specie ittiche di interesse commerciale, suddivise in pesci, molluschi bivalvi, molluschi cefalopodi, molluschi gasteropodi, tunicati ed echinodermi (Decreto MIPAF 27 marzo 2002). Tra questi:

Decreto MIPAF 14 gennaio 2005 *“Denominazione in lingua italiana delle specie ittiche di interesse commerciale ai sensi del Regolamento (CE) n. 2065/2001 della Commissione del 22 ottobre 2001”;*

Decreto MIPAF 25 luglio 2005 *“Modifiche ed integrazioni all’elenco delle*

denominazioni commerciali dei prodotti ittici, allegati al Decreto ministeriale del 14 gennaio 2005”;

Decreto MIPAAF (Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali) 31 gennaio 2008 *“Denominazione in lingua italiana delle specie di interesse commerciale – modifiche ed integrazioni dell’elenco di cui al decreto 25 luglio 2005”;*

Decreto MIPAAF 5 marzo 2010 *“Denominazione in lingua italiana delle specie ittiche di interesse commerciale – modifiche ed integrazioni dell’elenco allegato al decreto 27 marzo 2002 e successive modifiche e integrazioni”;*

Decreto MIPAAF 23 dicembre 2010 *“Denominazione in lingua italiana delle specie ittiche di interesse commerciale – modifiche ed integrazioni del DM del 31 gennaio 2008 successivamente modificato e integrato dal DM del 5 marzo 2010”;*

Decreto MIPAAF 12 agosto 2011 *“Attribuzione della denominazione in lingua italiana di alcune specie ittiche, che integra e modifica l’elenco allegato al DM del 31 gennaio 2008 e al DM del 23 dicembre 2010”.*

Come è possibile constatare, le regole applicative sono in continuo aggiornamento, tanto che il DM del 27 marzo 2002 ha vissuto, in meno di dieci anni, sei integrazioni riguardanti essenzialmente l’elenco delle denominazioni commerciali in lingua italiana delle specie ittiche. Il fenomeno è in parte spiegabile dall’introduzione di anno in anno di nuove specie, ma in realtà dimostra che anche specie di famiglie molto importanti dal punto di vista commerciale, come quella delle cernie, hanno cambiato denominazione nei diversi elenchi (Berrini *et al.*, 2011). La quantità di specie potenzialmente commercializzate nel nostro Paese nel 2011 arrivava a 925. Il valore rispetta il trend di ampliamento di questi documenti dovuto alla crescente importazione di specie mai commercializzate in precedenza, aggiunte di volta in volta agli elenchi.

ETICHETTATURA DEI PRODOTTI ALIMENTARI

Normativa comunitaria

Direttiva 395/1989/CEE e Direttiva 396/1989/CEE

Direttiva 2000/13/CE

Regolamento (CE) n. 853/2004 e Regolamento (CE) n. 854/2004

Regolamento (UE) n. 1169/2011

Normativa italiana di attuazione

Decreto Legislativo n. 109/1992

Decreto legislativo n. 181/2003

<p>ETICHETTATURA DEI PRODOTTI ITTICI</p> <p><i>Normativa comunitaria</i></p> <p>Regolamento (CE) n. 104/2000 e Regolamento (CE) n. 2065/2001</p> <p>Regolamento (CE) n. 1224/2009 e Regolamento (CE) n. 404/2011</p> <p><i>Normativa italiana di attuazione</i></p> <p>Decreto Ministeriale del 27 marzo 2002</p> <p>Elenco delle denominazioni in lingua italiana delle specie ittiche di interesse commerciale:</p> <ul style="list-style-type: none"> • D.M. 14 gennaio 2005 • D.M. 25 luglio 2005 • D.M. 31 gennaio 2008 • D.M. 5 marzo 2010 • D.M. 23 dicembre 2010 • D.M. 12 agosto 2011

Fig. 4.2: Quadro normativo per l'etichettatura dei prodotti ittici

Il **metodo di produzione** (“pescato”, “pescato in acque dolci”, “allevato”) può essere omissso per le specie pescate in mare, a condizione che risulti chiaramente dalla denominazione commerciale e dalla zona di cattura che si tratti di specie pescata in mare, a meno che ci siano dubbi sul metodo di produzione. Per i prodotti di acquacoltura è facoltà del venditore aggiungere alla dizione “allevato”, quella di “prodotto di acquacoltura”.

Per quanto riguarda la **zona di cattura**, per il pesce d'allevamento e per quello pescato in acque dolci basta riportare in etichetta il nome del Paese in cui è stato catturato o allevato, mentre, per quello pescato in mare, è necessaria la menzione di una delle zone di pesca tra le zone FAO (*Tab. 4.1*).

Zone di cattura	Definizione della zona
Atlantico nord-occidentale	Zona FAO n. 21
Atlantico nord-orientale	Zona FAO n. 27
Mar Baltico	Zona FAO n. 27.III.d
Atlantico centro-occidentale	Zona FAO n. 31
Atlantico centro-orientale	Zona FAO n. 34
Atlantico sud-occidentale	Zona FAO n. 41
Atlantico sud-orientale	Zona FAO n. 47
Mar Mediterraneo	Zona FAO n. 37.1, 37.2, 37.3
Mar Nero	Zona FAO n. 37.4
Oceano Indiano	Zona FAO n. 51 e 57
Oceano Pacifico	Zona FAO n. 61, 67, 71, 77, 81 e 87
Atlantico	Zona FAO n. 48, 58 e 88

Tab.4.1: Zone di pesca FAO (Allegato alla circolare 27 maggio 2002, n. 1329; Reg. CE n. 2066/2001)

In Italia è da poco stato pubblicato il **Decreto MIPAAF 25 luglio 2013** che “*definisce le modalità applicative di cui all’art. 59, commi 14 e 15 del D.L. 22 giugno 2012 n. 83, ai fini della definizione dell’intestazione di origine, anche in relazione alla identificazione delle zone di cattura e/o di allevamento nonché alla conformità alle disposizioni del Reg. (CE) n. 2065/2001*”. Ai fini del presente decreto si intende per:

- **Attestazione di origine:** la dicitura “prodotto italiano” o altra indicazione relativa all’origine italiana o alla zona di cattura più precisa di quella obbligatoriamente prevista dalle disposizioni vigenti in materia riportata nelle etichette e in qualsiasi altra informazione fornita per iscritto al consumatore finale;
- **Prodotto italiano:** i prodotti provenienti dall’attività di pesca professionale esercitata da pescherecci battenti bandiera italiana nelle GSAs (*Geographical SubAreas*) di cui all’Allegato I al presente decreto, ovvero provenienti da impianti di acquacoltura in acque dolci, salmastre o marine del territorio nazionale. (Tab 4.2)

GSA	Area
GSA 9	Mar Ligure e Tirreno Settentrionale
GSA 10	Mar Tirreno Meridionale
GSA 11.2	Mar di Sardegna (Orientale)
GSA 17	Mar Adriatico Settentrionale
GSA 18	Mar Adriatico Meridionale (parte)
GSA 16	Mar di Sicilia Meridionale
GSA 19	Mar Ionio Occidentale
GSA 20	Mar Ionio Orientale
GSA 21	Mar Ionio Meridionale

Tab.4.2: Definizione delle *Geographical SubAreas* in conformità alla Risoluzione FAO/GFCM/33/2009/2. D.M. 25 luglio 2013.

Secondo quanto previsto dall’articolo 6 del Regolamento (CE) n. 2065/2001, laddove venga messo in vendita un miscuglio di specie diverse, le informazioni relative alla denominazione commerciale, al metodo di produzione e alla zona di cattura devono essere fornite per ciascuna specie; quando sia posto in vendita un miscuglio di specie identiche, il cui metodo di produzione è diverso, occorre indicare il metodo di produzione di ogni partita; quando infine sia posto in vendita un miscuglio di specie identiche, la cui zona di cattura o paese di allevamento è diverso, occorre indicare almeno la zona della partita quantitativamente più rappresentativa, con l’avvertenza che il prodotto proviene, quando si tratta di un prodotto della pesca, da zone di cattura diverse e, quando si tratta di prodotti d’allevamento, da Paesi diversi.

Il Regolamento è applicabile anche ai prodotti importati da Paesi Terzi, ma non:

- ✓ Ai piccoli quantitativi di prodotti venduti direttamente ai consumatori dai pescatori

o dai produttori di acquacoltura;

- ✓ Ai prodotti a base di pesce non menzionati all'articolo 4 del Regolamento (CE) n. 104/2000, perciò i filetti crudi semplicemente ricoperti di pasta o di pane grattugiato (impanati), i surimi, il tonno e le sardine sott'olio ed altre preparazioni (cottura) e conserve di pesci, di crostacei e molluschi;
- ✓ Ai prodotti immessi sul mercato etichettati prima del 1° gennaio 2002 (per permettere che anche gli imballaggi non conformi alle disposizioni del regolamento potessero essere commercializzati fino ad esaurimento delle scorte).

Per i prodotti della pesca trasformati si deve fare riferimento a quanto previsto dal D. Lgs. n. 109/1992 e successive modifiche: i prodotti della pesca trasformati vedranno nella indicazione degli ingredienti la denominazione “pesce”, se non viene posta in essere alcuna specifica specie ittica come previsto dall'Allegato I della Direttiva 2000/13.

Anche la medusa, che di recente ha ottenuto una denominazione commerciale in lingua italiana, rientra appieno all'interno dei prodotti della pesca. Purtroppo, in relazione alla numerosità di specie utilizzate per scopi alimentari, all'enorme somiglianza morfologica fra specie differenti e alle modifiche che subisce il prodotto durante la lavorazione, non risulta semplice effettuare un controllo ispettivo su tale prodotto. Si rimanda pertanto, per quanto riguarda l'identificazione di specie nei prodotti della pesca lavorati, al Capitolo 5.

4.3.1 Etichettatura prodotti a base di medusa: evoluzione normativa e problematiche di tracciabilità

Nel caso specifico dei prodotti a base di medusa, è stato notato che spesso la denominazione cinese “medusa” viene, volontariamente o involontariamente, tradotta in lingua italiana “Tubero di senape” o “bamboo”; determinando una non conformità rispetto ai principi di identificazione, tracciabilità e rintracciabilità e requisiti di trasparenza stabiliti dalle direttive comunitarie 89/395/CEE, 89/396/CEE (D. Lgs no. 109/92) e 2000/13/CE (D. Lgs no. 181/2003) sull'etichettatura. *“L'etichettatura e le relative modalità di realizzazione non devono essere tali da indurre in errore l'acquirente, specialmente per quanto riguarda le caratteristiche del prodotto alimentare e in particolare la natura, l'identità, le qualità, la composizione, la quantità, la conservazione, l'origine o la provenienza, il modo di fabbricazione o di ottenimento [...]”* (Direttiva 2000/13/CE; Articolo 2.1.a) e confermati nel Reg CE 178/2002 (art16 –Presentazione: *“Fatte salve disposizioni più specifiche della legislazione alimentare, l'etichettatura, la pubblicità e la presentazione degli alimenti o mangimi, compresi la loro forma, il loro aspetto o confezionamento, i materiali di confezionamento usati, il modo in cui gli alimenti*

o mangimi sono disposti, il contesto in cui sono esposti e le informazioni rese disponibili su di essi attraverso qualsiasi mezzo, non devono trarre in inganno i consumatori.”La ragione che porta tendenzialmente ad escludere l’errore involontario di etichettatura bensì a pensare ad una volontaria operazione fraudolenta risiede nel fatto che il *Phylum Cnidaria*, pur appartenendo a pieno titolo ai prodotti della pesca così come definiti dalla normativa comunitaria: “*tutti gli animali marini o di acqua dolce (ad eccezione dei molluschi bivalvi vivi, echinodermi vivi, tunicati vivi e gasteropodi marini vivi e di tutti i mammiferi, rettili e rane), selvatici o di allevamento, e tutte le forme, parti e prodotti commestibili di tali animali*”, non rientra nell’elenco dei prodotti ittici nazionali (Castigliego *et al.*, 2009). Inoltre, non è contemplato neanche nelle più recenti integrazioni ministeriali, relative alle denominazioni commerciali emanate nel 2010 (Decreto del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali del 5 marzo 2010 relativo alla denominazione italiana di specie ittiche nell’elenco di cui al decreto del 27 marzo del 2002 e successive modifiche e integrazioni pubblicato sulla G.U. n. 124 del 29 maggio 2010; Decreto del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali del 23 dicembre 2010 Attribuzione delle denominazioni in lingua italiana delle specie ittiche di interesse commerciale, ai sensi del Regolamento (CE) 104/2000, Titolo I e del Regolamento (CE) 2065/2001 pubblicato sulla G.U. n. 11 del 15 gennaio 2011), dove fra gli invertebrati acquatici si ritrovano soltanto molluschi crostacei echinodermi e tunicati (Castigliego *et al.*, 2009).

CAPITOLO 5

IDENTIFICAZIONE DI SPECIE NEI PRODOTTI A BASE DI PESCE

Negli ultimi anni la richiesta di prodotti della pesca è notevolmente aumentata. Il rapporto FAO del 2012 stima che la produzione mondiale complessiva di pesce e di prodotti ittici per il consumo umano sia passata da 128 milioni di tonnellate nel 2010 a 131 milioni di tonnellate nel 2011. La pesca e l'acquacoltura nel complesso danno occupazione a circa 54,8 milioni di persone e, i prodotti ittici, risultano essere le derrate più scambiate sui mercati (FAO, 2012).

Sul mercato comunitario è dunque inevitabilmente presente una grande quantità di pesci, crostacei e molluschi provenienti, non solo dalle acque mediterranee ed europee, ma da ogni parte del mondo, prodotti sui quali si devono effettuare i necessari controlli a tutela del consumatore (Campagna *et al.*, 2008). A tal proposito, gli ispettori sanitari (veterinari, vigili sanitari, carabinieri del NAS, ufficiali della capitaneria di porto, guardie di finanza) sempre più spesso si trovano in difficoltà nel riconoscimento di specie (Armani *et al.*, 2012). Questa difficoltà non è dovuta soltanto alla crescente offerta di nuove specie ittiche sul mercato, ma anche alla sempre maggiore presenza di nuove tipologie di prodotti diverse dal pesce intero, quali filetti, bocconcini, tranci, spiedini, crocchette ecc. Infatti, come già accaduto per altri settori, anche per il comparto ittico si è assistito ad un aumento dei c.d. *convenience food*, cioè di prodotti pronti da cucinare o da consumare (Warde, 1999), nei quali le caratteristiche morfologiche identificative non sono più presenti (Galimberti *et al.*, 2013). In particolare, questa vasta diversificazione dell'offerta espone il mercato ittico, più facilmente rispetto agli altri comparti produttivi, a frodi commerciali per sostituzione che vengono attuate sostituendo specie pregiate con altre di minor valore. Il riconoscimento di specie assume perciò un'importanza sempre maggiore non solo per contrastare le frodi commerciali, ma anche per le possibili implicazioni di carattere sanitario: può capitare infatti che specie potenzialmente tossiche entrino nei nostri circuiti commerciali (Armani *et al.*, 2012).

In questo nuovo scenario, il metodo di riconoscimento delle specie ittiche edibili, basato sull'identificazione morfologica delle caratteristiche anatomiche del pesce intero (secondo chiavi dicotomiche proposte dalla FAO), che in questo settore rappresenta il metodo

tradizionale (Civera & Bottero, 2007), non è più sufficiente a garantire in maniera ottimale la tutela del consumatore e si rivela pertanto indispensabile ricorrere a specifiche tecniche di laboratorio. Ad oggi non esiste tuttavia, a livello Comunitario, alcun sistema analitico ufficiale per l'identificazione di specie di prodotti della pesca (Campagna *et al.*, 2008). Lo sviluppo di questo tipo di metodiche richiede infatti una soddisfacente quantità di dati, il cui accesso da parte dei laboratori è tuttavia ancora difficoltoso a causa della mancanza di formati standardizzati e di *database* centralizzati in grado di garantire la cooperazione e lo scambio di conoscenze tra i gruppi di ricerca (Condoleo *et al.*, 2011). Recentemente l'*European Commission Joint Research Centre* (JRC) ha pubblicato un report intitolato "*Detering Illegal Activities in the Fisheries Sector*" (Martinsohn, 2011), che illustra le attuali metodiche chimiche, biomolecolari e forensi in grado di garantire la tracciabilità dei prodotti ittici ed ha previsto che, grazie alle innovazioni che caratterizzano questo settore ed alla riduzione dei costi, le metodiche basate sull'analisi del DNA hanno le potenzialità per diventare i sistemi di controllo ufficiali impiegati a livello delle agenzie europee di controllo.

5.1 TECNICHE DI LABORATORIO PER L'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE

Le tecniche di laboratorio impiegate nell'identificazione delle specie ittiche sono molteplici e tra loro molto eterogenee. Fra queste ricordiamo quelle che si basano sull'analisi degli **acidi grassi**, che sono molecole organiche semplici utilizzate da tutti gli organismi viventi quali elementi strutturali e fonte di energia. Negli animali marini sono infatti presenti circa 20 differenti acidi grassi ma, l'eventuale presenza e la concentrazione dei singoli acidi grassi di una specie ittica (il c.d. "profilo lipidico") oltre ad essere fortemente determinata dalla genetica (Kwetegyeka *et al.*, 2008) può variare in maniera significativa, anche tra animali appartenenti alla stessa specie ma provenienti da aree geografiche differenti, in relazione alle condizioni ambientali, come il tipo di alimentazione o la temperatura e la salinità dell'acqua (Grahl-Nielsen, 2005). Di conseguenza, tale tecnica analitica è applicabile quasi esclusivamente laddove i prodotti provengano dalla stessa area geografica in maniera tale che l'ambiente non abbia in alcun modo potuto incidere sul loro profilo lipidico. Per ovviare al problema della provenienza, hanno recentemente acquisito una notevole importanza le tecniche di analisi basate sugli **isotopi stabili** (Campana *et al.*, 2000). La composizione chimica dei tessuti duri di un pesce (in particolare scaglie e otoliti) riflette infatti le proprietà chimiche e fisiche

dell'ambiente al quale il soggetto è stato esposto e, poichè i differenti habitat hanno una composizione chimica differente (acque, sedimenti, cibo), essa può essere impiegata per stabilire la zona di origine del soggetto. In particolare, viene studiata la concentrazione di elementi quali il litio, il magnesio, lo stronzio, il bario, il ferro e il piombo (Campana *et al.*, 2000).

Molte tecniche di identificazione di specie si basano invece sulla rilevazione dei polimorfismi genetici, ovvero sulle variazioni genetiche che intercorrono tra gli individui. Lo studio delle **proteine** rappresenta una modalità ancora molto utilizzata per rilevare tali polimorfismi, perché la sequenza amminoacidica di una proteina è conseguenza diretta dell'espressione genica. Per evidenziare tali variazioni le metodiche identificative utilizzano tecniche elettroforetiche, ovvero sfruttano la capacità delle proteine di migrare in un mezzo quando sono immerse in un campo elettrico. Lo spostamento che si viene a generare è strettamente legato alle proprietà chimico fisiche della proteina (Griffiths *et al.*, 2000) e spesso è sufficiente la variazione di singoli amminoacidi per cambiare il tracciato elettroforetico della proteina e quindi rilevare eventuali polimorfismi genetici in grado di differenziare soggetti appartenenti a specie diverse (Rehbein, 2003). A tal fine, in passato, si è spesso ricorsi ai metodi di identificazione basati sull'isoelettrofocalizzazione (IEF) delle proteine sarcoplasmatiche di pesce (Berrini *et al.*, 2006). Questa metodica è stata ufficializzata nel 1995 negli Stati Uniti dalla *Food & Drug Administration* (FDA) come metodo di identificazione ufficiale delle specie ittiche (Cunniff, 1995). Ad oggi, non risulta ancora ufficializzata nell'Unione Europea, sebbene si tratti di un metodo di laboratorio di frequente impiego anche a livello Comunitario e Nazionale. Questa tecnica è stata ad esempio messa a punto per l'identificazione delle differenti specie di Pesce palla, specie tossiche per l'uomo in relazione alla presenza di tetrodotossina, ed utilizzata per analizzare prodotti a base di pesce venduti sul mercato di Taiwan (Chen *et al.*, 2003). Tuttavia, l'IEF si è rivelata di scarsa utilità soprattutto nell'identificazione di specie nei prodotti trasformati, in relazione all'azione denaturante che, i trattamenti fisico/chimici applicati nell'industria alimentare, hanno sulle proteine. Altri limiti nell'applicazione dell'IEF sono date dall'omologia delle proteine in specie filogeneticamente correlate e dall'elevato polimorfismo di alcune proteine frequentemente osservato in alcune specie (Rehbein *et al.*, 2003). Altre metodiche come la *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) e l'*Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) sono state utilizzate nel settore ittico, ma anch'esse presentano limitazioni in relazione al trattamento subito dal prodotto, il quale può determinare la perdita di epitopi termolabili e cross-reazioni nel caso di matrici alimentari composite (Knuutinen & Harjula, 1998; Asensio *et al.*, 2008).

In seguito agli enormi progressi scientifici nel campo della biologia molecolare, l'analisi degli **acidi nucleici** è ad oggi considerata la tecnica d'elezione per l'identificazione di specie in ambito ispettivo (Guidi *et al.*, 2008). Conoscere le sequenze del DNA di un soggetto equivale infatti a tracciarne una vera e propria impronta digitale, consentendo di discriminare anche individui geneticamente molto simili. Tutte le informazioni genetiche presenti in un organismo sono infatti riunite nel DNA, ed inoltre non cambiano in base al tipo di tessuto analizzato; non importa, quindi, se il campione utilizzato per le analisi viene prelevato dal muscolo, dal sangue, dal fegato o da altri tessuti, poiché ogni cellula di quell'organismo contiene al suo interno la stessa informazione genetica. L'utilizzo di metodiche biomolecolari che si basano sull'analisi delle sequenze di DNA può inoltre risolvere il problema legato all'identificazione di specie in prodotti lavorati e trasformati, dato che la molecola bersaglio, il DNA, oltre a consentire una discriminazione molto specifica, è relativamente stabile ai numerosi trattamenti che avvengono durante la trasformazione dei cibi (affumicatura, salagione, acidificazione, trattamento termico ecc.), al contrario dei target utilizzati nelle altre metodiche (Galimberti *et al.*, 2013). Le tecniche di analisi degli acidi nucleici sono dunque indirizzate ad individuare differenze nelle sequenze del genoma di individui appartenenti a popolazioni, specie o generi diversi, al fine di classificarli. Tali sequenze identificative sono dette “marcatori molecolari”. Un marcatore molecolare è definito come quel segmento di DNA cromosomico, solitamente tra 50 e 3.000 paia di basi, che, in virtù della sua presenza, contraddistingue in modo caratteristico ed inequivocabile una determinata regione del DNA e quindi l'individuo a cui appartiene. Negli ultimi decenni sono stati sviluppati differenti tipi di marcatori molecolari, utilizzando tecniche di tipo RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), VNTR o minisatellite (*Variable Number of Tandem Repeat*), SSR o microsatelliti (*Simple Sequence Repeat*), CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*), EST (*Expressed Sequence Tag*), SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). I marcatori molecolari applicati all'analisi del genoma hanno permesso di acquisire una enorme quantità di informazioni sulla struttura dei genomi stessi, nonché sulla natura dei geni e dei prodotti genici, ed hanno permesso soprattutto di analizzare l'organizzazione di singoli genomi e valutarne le relazioni filogenetiche. Paul Herbert, un genetista dell'università canadese di Guelph, ha proposto, nel 2003, un nuovo metodo per accelerare il processo di identificazione delle specie: utilizzare brevi sequenze di DNA in modo analogo ai codici a barre dei supermercati (c.d. *DNA Barcoding*). Secondo Herbert, ogni specie potrebbe essere “etichettata” con una sequenza nucleotidica di DNA

univocamente associata a quella specie, da utilizzare come riferimento per comparare la sequenza di DNA di una potenziale nuova specie. Una delle più importanti componenti di questa iniziativa è stata la costruzione di un *database* pubblico contenente tutte le sequenze delle specie già identificate in modo da poter confrontare le sequenze ottenute in laboratorio con quelle disponibili e catalogate negli anni. I database sono una preziosa fonte di sequenze di differenti tratti di DNA di moltissime forme viventi. Uno dei più importanti è **GenBank**, database realizzato dal *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e accessibile all'indirizzo: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Questo database, tuttavia, non risulta adatto nella sicura identificazione di specie in ambito ispettivo basata sull'analisi BLAST (*Basic Local Alignment Tool*) in quanto non è prevista alcuna forma di controllo sulle informazioni inserite. Per far fronte a ciò sono nate diverse iniziative con l'obiettivo di costituire banche dati sicure dal punto di vista dei controlli delle sequenze depositate. Tra questi, i più accreditati sono il *Consortium for the Barcoding of Life*, *FishTrace Consortium* e *Fishgen* (*European Commission, Joint Research Center Institute for Systems, Informatics and Safety & Environment Institute*). Quest'ultimo ha come obiettivo quello di creare un database per l'identificazione dell'origine del pesce, permettendo anche l'identificazione dei diversi stock ittici con la combinazione di differenti tecniche molecolari. *Fishtrace* è un consorzio finalizzato dalla Comunità Europea, che si pone l'obiettivo di individuare i polimorfismi utili a identificare le diverse popolazione di pesci delle acque europee fornire informazione a partire dalle sequenze del gene mitocondriale del citocromo b e del gene nucleare della rodopsina (Bernardi *et al.*, DNA Barcoding). Il consorzio del Barcoding of Life (BOLD) si pone l'obiettivo di raccogliere le sequenze del gene della citocromo-ossidasi subunità I (COI), eletto a "target ufficiale" in quanto particolarmente promettente per l'identificazione delle specie animali. Questo gene, infatti, presenta una variabilità limitata nell'ambito della stessa specie, mentre il grado di variabilità aumenta in individui appartenenti a specie diverse. Il BOLD è accessibile dal sito www.boldsystem.org.

5.1.1 Cenni sulla struttura del DNA e sull'espressione genica (Mathews *et al.*, 2004)

Il termine genoma indica la totalità del materiale genetico contenuto in un organismo. Esso è organizzato in cromosomi contenuti nel nucleo cellulare ed assicura la trasmissione delle informazioni genetiche. L'acido deossiribonucleico (DNA) contiene infatti le informazioni genetiche necessarie alla biosintesi di RNA e proteine. Secondo il modello di Watson e Crick, le molecole di DNA sono formate da due lunghi filamenti avvolti a spirale a formare una doppia elica. Dal punto di vista chimico, ciascun filamento del DNA è un polimero di

nucleotidi, ovvero è formato da molti nucleotidi che si susseguono. Ciascun nucleotide è formato dall'unione di un *nucleoside* con un gruppo fosfato. Il nucleoside è la combinazione di uno zucchero a 5 atomi di carbonio (il deossiribosio) e una delle quattro basi azotate tipiche degli acidi nucleici. E' possibile classificare le basi del DNA in pirimidine e purine a seconda della struttura chimica che presenta. Sono pirimidine la citosina (indicata con C) e la timina (T), mentre sono purine la guanina (G) e l'adenina (A). I nucleotidi possono essere considerati molecole con direzionalità perchè presentano gruppi fosfato (PO₄) e gruppi idrossilici (OH) attaccati al loro carbonio 5' e 3' rispettivamente. Il DNA consiste in due catene portanti avvolte a spirale, composte da unità alternate di acido fosforico e deossiribosio legate fra loro da elementi trasversali di basi di purina e pirimidina (attaccate all'atomo di carbonio di ogni zucchero). L'accoppiamento fra le basi (*base pairing*, indicato con bp) sulle catene polinucleotidiche è univoco: l'adenina si accoppia solo con la timina e la guanina solo con la citosina. Inoltre, la coppia T-A è tenuta insieme da due legami a idrogeno, mentre la coppia C-G da tre. Essendo possibile formare solo specifiche coppie di basi, data la sequenza di basi su una delle sue catene, la sequenza sull'altra catena è determinata automaticamente (le basi sono complementari). Nella doppia elica i due filamenti complementari sono allineati in modo "antiparallelo": le due sequenze di basi accoppiate sono legate a scheletri zucchero-fosfato disposti in senso opposto (una cresce aggiungendo nucleotidi in posizione 5', l'altra in posizione 3'). La doppia elica può essere separata nei due filamenti che la compongono (la separazione dei filamenti è detta *denaturazione*) sottoponendola a un trattamento che rompe i legami a idrogeno in condizioni di pH molto acido o molto alcalino, o aumentando opportunamente la temperatura. Il numero delle basi nel DNA è variabile in funzione del tipo di organismo. Tali basi sono sistemate in specifiche sequenze il cui insieme è detto genoma. L'informazione genetica della molecola è codificata dalle basi (A, T, C e G) nel DNA e, in una data cellula, l'ordine con cui le basi sono disposte lungo la catena non è casuale ma contiene il "programma" che regola e distingue forma di vita diverse. Dato che A si appaia sempre con T, e G sempre con C, i due filamenti sono complementari, e sono legati fra loro tramite legami a idrogeno che si formano fra le basi di due catene che si trovano una di fronte all'altra. Con il termine **espressione genica** si intende il processo attraverso cui l'informazione contenuta in un gene (sequenza di DNA) viene copiata in RNA messaggero per poi essere tradotta in una macromolecola funzionale, tipicamente una proteina durante il processo di traduzione. Il ruolo del gene che codifica una determinata proteina è quello di specificare la natura e l'ordine degli aminoacidi che la compongono. I geni variano in lunghezza fra loro e spesso sono composti da migliaia di basi; solo una

parte di queste sequenze di basi (dette esoni) è in grado di codificare le proteine, mentre la restante parte, apparentemente non codificante (introni) sembra avere un ruolo decisivo di controllo (ad esempio gli introni sembrano regolare le interazioni tra geni diversi) (Primer on Molecular Genetics, 1992 <http://www.esp.org/misc/genome/primer.pdf>).

5.1.2 Il DNA mitocondriale (mtDNA)

Ad eccezione dei batteri, delle alghe azzurre e di alcune cellule altamente specializzate, come per esempio i globuli rossi, negli esseri viventi, oltre al DNA nucleare, contenuto nel nucleo della cellula, è presente anche il DNA mitocondriale (mtDNA), extra-nucleare. Quest'ultimo si trova all'interno dei mitocondri, organelli specializzati della cellula presenti in alcune migliaia di copie (800-2.500) nel citoplasma. La sua specifica funzione consiste proprio nella regolazione di questi organelli che presiedono all'attività energetica della cellula. E' organizzato in una molecola circolare (ad anello) a doppio filamento, costituito da un numero medio di basi compreso fra 16.000 e 19.000. Esistono comunque notevoli differenze fra i vari organismi, con punte estreme comprese fra le 14.000 pb nel nematode *Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1900) e le 42.000 pb nel mollusco bivalve *Placoepecten megellanicus* (Gmelin, 1791) (Wolstenholme, 1992). I due filamenti sono distinguibili l'uno dall'altro per il differente peso molecolare e sono indicati convenzionalmente con H (*Heavy*) quello più ricco di Adenina e Guanina (A e G) e con L (*Light*) quello complementare, più ricco di Timina e Citosina (T e C). I geni contenuti nei genomi mitocondriali di tutti gli animali multicellulari e di alcuni protozoi, sono per la maggior parte localizzati nella catena H e sono quasi tutti codificanti: essi codificano per 2 subunità ribosomiali (16s e 23s), 22 RNA di trasporto e 13 proteine (Avisé, 1986), 6 delle quali sono enzimi o porzioni di enzimi coinvolti nella fosforilazione ossidativa come il citocromo b (*cyt b*), la subunità I-III della citocromo C ossidasi (COI-III) e la subunità 6 e 8 del complesso ATPasico (*ATPase6* e *ATPase8*).

Il DNA mitocondriale evolve negli animali con un tasso 5-10 volte maggiore rispetto al DNA nucleare (Brown *et al.*, 1979): tale proprietà è dovuta a due fattori:

1. Il limitato numero di geni presenti ed il ruolo da essi svolto che sembrerebbe essere causa di una minore accuratezza nei meccanismi di replicazione;
2. L'ambiente particolarmente ricco di radicali dell'ossigeno originati dalla catena respiratoria.

E' quindi evidente che l'elevata frequenza di mutazione unitamente alla ridotta pressione selettiva contro le mutazioni stesse, determina l'elevata variabilità del DNA mitocondriale. Sebbene il contenuto informativo del genoma mitocondriale sia alquanto esiguo se

raffrontato a quello nucleare, la quantità relativa di DNA mitocondriale è piuttosto grande, grazie appunto all'elevato numero di mitocondri presenti nel citoplasma. A parità di numero di cellule del campione da analizzare, dunque, il numero di copie di un gene localizzato sul DNA mitocondriale è molto superiore al numero di copie di un gene localizzato sul DNA nucleare (per quest'ultimo nella maggior parte dei geni si dispone di due copie per cellula) ed è più resistente al tempo ed agli stress termici. Per questo motivo può essere recuperato ed analizzato anche in quei prodotti che hanno subito trattamenti tecnologici spinti (cottura, sterilizzazione ecc.) (Bossier, 1999).

Infine, mentre il DNA nucleare viene trasmesso come combinazione del DNA nucleare di entrambi i genitori, quello mitocondriale viene trasmesso in blocco da madre a figlio ed è quindi caratterizzato dall'assenza di eventi di ricombinazione genetica, cioè scambi di materiale genetico tra cromosomi. Essendo ereditato per via materna, il mtDNA rappresenta dunque un singolo allele (aplotipo mitocondriale), caratterizzato dalla combinazione di mutazioni, spesso numerose, associate tra loro.

Per tutti i suddetti motivi il mtDNA rappresenta la molecola d'elezione per le applicazioni di biologia molecolare al fine del riconoscimento di specie. A causa delle sue ridotte dimensioni, esso è stato il primo genoma eucariotico ad essere completamente sequenziato nell'uomo (Anderson *et al.*, 1981) e molti altri genomi mitocondriali di diversi organismi sono stati recentemente sequenziati ed attualmente disponibili sul sito MitBase (<http://www.ebi.ac.uk/htbin/Mitbase/mitbase.pl>), un database integrato ed esauriente del DNA mitocondriale. La conoscenza di diversi mtDNA completi ha permesso non solo di disegnare set robusti di primer universali in grado di coprire specifici segmenti del cromosoma mitocondriale in un ampio range di eucarioti (Folmer *et al.*, 1994), ma anche primer specifici per alcune specie.

5.1.3 Geni mitocondriali

I geni mitocondriali maggiormente utilizzati sono sia quelli che codificano per le subunità dell'RNA ribosomiale (12srRNA-16srRNA) sia quelli che codificano per le 3 subunità della Citocromo C Ossidasi (in particolare per la Citocromo C Ossidasi I- *COI*) e per il citocromo b (*cyt b*) (Saccone *et al.*, 1999). Tra questi, il *COI* è quello riconosciuto dalla maggior parte degli autori quale gene target negli studi filogenetici, in quanto dotato di un potenziale discriminatorio maggiore rispetto agli altri (Hebert *et al.*, 2003). Infatti, è stato osservato che anche sequenze nucleotidiche relativamente brevi (100-200 bp) possono fornire informazioni accurate relativamente alla specie di appartenenza (Hajibabaei *et al.*, 2006). Per l'amplificazione di questo gene sono pertanto stati progettati numerosi primer

universali (*Tab. 5.1*) (Single Laboratory Validated Method for DNA-Barcoding for the Species Identification of Fish for FDA Regulatory Compliance, 2011; Handy *et al.*, 2011; Kochzius *et al.*, 2010).

Primer name	Sequence code	Position	Amp. Length (bp)	Ref.
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	4417-4441	708	Folmer, 1994
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	5100-5125		
FishF1	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	4419-4444	703/706	Ward, 2005
FishF2	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	4419-4444		
FishR1	TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA	5100-5125		
FishR2	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	5097-5122		
COIF-ALT	ACAAATCAYAARGAYATYGG	4422-4441	698	Mikkelsen, 2006
COIR-ALT	TTCAGGRTGNCRAARAAYCA	5100-5120		
FF2d	TTCTCCACCAACCACAAAGAYATYGG	4416-4441	707	Ivanova, 2007
FR1d	CACCTCAGGGTGTCGAARAAYCARAA	5097-5123		
FISH-BCL	TCAACYAATCAYAAAGATATYGGCAC	4419-4444	706	Baldwin, 2009
FISH-BCH	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	5100-5125		
COI-Fish-F	TTCTCAACTAACCAAYAAGAYATYGG	4416-4441	709	Kochzius, 2010
COI-Fish-R	TAGACTTCTGGGTGCCRAARAAYCA	5100-5125		
FISHCOILBC _{ts}	CACGACGTTGTAAACGACTCAACYAATCAYAAAGATATYGGCAC	4418-4444	705	Handy, 2011
FISHCOIHBC _{ts}	GGATAACAATTTACACAGGACTTCYGGGTGCCRAARAATCA	5100-5123		
SPACOIREV	GGATAACAATTTACACAGGACTTCYGGGTGCCRAARAATCA	5100-5123	705*	This study
REVshort1	GGATAACAATTTACACAGGGGYATNACTATRAAGAAAATTATTAC	XX	192*	This study

Tab. 5.1: Primer universali per l'amplificazione del gene COI dal pesce. La posizione dei primer è stata calcolata in base alle sequenze del *Pagrus auriga*. Fonte: Armani *et al.*, 2012.

Infatti, lo scopo principale dei ricercatori che operano in questo campo è quello di riuscire a realizzare un primer “ideale”, in grado cioè di amplificare il gene in questione nel maggior numero di specie possibile. Sebbene ancora questo obiettivo non sia stato raggiunto, gli ultimi studi si sono rivelati molto promettenti (Armani *et al.*, 2012). Tra questi, si riportano ad esempio le prove fatte dall’FDA con l’utilizzo di primer degenerati sviluppati modificando i primer universali originariamente progettati da Baldwin *et al.* (Single Laboratory Validated Method for DNA-Barcoding for the Species Identification of Fish for FDA Regulatory Compliance, 2011; Baldwin *et al.*, 2009), ai quali sono stati poi aggiunti dei corti frammenti nucleotidici (code) progettati da Steffens *et al.* (1993). Talvolta l’identificazione di specie utilizzando le sequenze del gene *COI* può tuttavia risultare insidiosa a causa della presenza di alcuni “frammenti” di DNA che determinano fenomeni di cross-reazione con il frammento target. In particolare, esistono degli pseudogeni mitocondriali nucleari le cui sequenze sono molto simili a quelle del gene *COI* e che, pertanto, vengono spesso co-amplificati con esso compromettendo l’analisi filogenetica (Song *et al.*, 2008). Oltre che per il *DNA Barcoding*, il *COI* viene considerato il gene d’elezione anche in altre tecniche molecolari, quali la PCR-RFLP e la multiplex PCR (Espineira *et al.*, 2008; Rasmussen Hellberg *et al.*, 2010). Un altro gene ampiamente

utilizzato nell'identificazione delle specie ittiche è il *cyt b*, il quale è risultato spesso utile nella discriminazione di organismi differenti grazie al fatto che il suo grado di variabilità inter-specifica è molto superiore a quello intra-specifico (Barlett & Davidson, 1991). Infine, da ricordare anche il gene che codifica per la subunità 16 dell'RNA ribosomiale (**16S**), che presenta anch'esso un buon grado di conservazione e variabilità inter-specifica, sebbene venga utilizzato con sempre minore frequenza poiché, come è stato detto, la maggior parte delle analisi filogenetiche si basano sulle sequenze del *COI* e del *cyt b*.

5.2 METODICHE DI ESTRAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI

L'isolamento e la purificazione degli acidi nucleici sono i primi delicati passi nella maggior parte delle applicazioni di biologia molecolare. L'ottimizzazione dell'estrazione dipende:

- Dal tipo di acido nucleico che si vuole isolare (DNA o RNA);
- Dalla fonte utilizzata per l'estrazione (tessuti animali o vegetali, cellule eucariotiche o procariotiche ecc.);
- Dal materiale biologico contenente la fonte degli acidi nucleici usato per l'estrazione (organo intero, sangue ecc.);
- Dall'applicazione prevista nel post-estrazione.

Indipendentemente dalla tecnica di estrazione usata, essa deve rispondere a due requisiti principali: la **resa** e la **purezza**, intesa sia come presenza in soluzione dell'acido nucleico in esame, sia come assenza di sostanze contaminanti che, legandosi ai reagenti in soluzione, potrebbero modificare i risultati delle successive applicazioni (Focà & Lamberti, 2003). Una buona preparazione di DNA genomico è alla base della buona riuscita di qualunque analisi di biologia molecolare. Normalmente è sufficiente che durante la purificazione il DNA si mantenga in frammenti di 50-100 kilobasi (kb) per poter effettuare qualsiasi analisi successiva. Dopo aver scelto il campione biologico da cui estrarre il materiale genetico, il percorso di estrazione e purificazione prevede quattro fasi:

1. **Lisi delle cellule.** La distruzione della membrana cellulare è una fase delicata in quanto risultato di due eventi contrastanti: da una parte l'esigenza di frammentare il materiale di partenza, dall'altra quella di non alterare in alcun modo gli acidi nucleici da analizzare. I metodi tradizionali si basano su trattamenti complessi che includono la digestione enzimatica, la solubilizzazione tramite detergente o tecniche meccaniche di spaccatura. Esistono inoltre metodi di lisi basati su shock osmotico (Cunha *et al.*, 2001) ed ultrasuoni.
2. **Inattivazione delle nucleasi cellulari.** L'inattivazione delle proteine cellulari

avviene in maniera diversa a seconda se il materiale genetico da estrarre è rappresentato da DNA o RNA. Quando l'acido nucleico è il DNA, si utilizza la proteinasi K, una proteinasi molto attiva, isolata dal fungo saprofito *Tritirachium album*, che digerisce le proteine associate all'acido nucleico ed inattiva tutte le nucleasi cellulari. Nel caso dell'RNA invece, i tessuti o le cellule sono omogeneizzate in un tampone contenente un detergente ad alta concentrazione (SDS o Sarcosyl), un agente dissociante (cloruro o isotiocianato di guanidinio), una soluzione tampone (acetato) ed un agente riducente (2-mercaptoetanol o DTT), in modo da inibire le RNasi endogene, denaturare gli acidi nucleici e dissociare le proteine che potrebbero esservi fissate (Focà *et al.*, 2003);

3. **Separazione e recupero dell'acido nucleico dalla soluzione contenente il lisato cellulare**, con separazione dell'acido nucleico dai residui cellulari e dalle sostanze interferenti. I metodi classici prevedono l'utilizzo di solventi organici come il fenolo ed il cloroformio. Il fenolo è un potente denaturante delle proteine in quanto, legandosi ad esse attraverso legami a H, ne altera la struttura. Le proteine denaturate, con i gruppi idrofobici esposti, diventano solubili nella fase fenolica o precipitano all'interfase fenolo acqua; il fenolo è fortemente igroscopico, e deve essere sempre equilibrato con una soluzione tampone perché altrimenti assorbirebbe la soluzione acquosa contenente gli acidi nucleici. Il cloroformio completa la denaturazione delle proteine, rimuove i lipidi e, grazie alla sua elevata densità, facilita la separazione della fase acquosa (contenente il DNA deproteinizzato) da quella organica (fenolica), stabilizzando l'interfaccia tra le due fasi. Un metodo alternativo per la separazione della componente proteica dagli acidi nucleici è l'estrazione *salting out*, che sfrutta il principio secondo il quale, ad alte concentrazioni di sali, la solubilità delle proteine diminuisce bruscamente (*salting out*) causando la precipitazione delle stesse. Questo metodo prevede la lisi delle cellule mediante tampone di lisi classico e il trattamento con la Proteinasi K allo scopo di estrarre gli acidi nucleici e degradare le proteine presenti che vengono allontanate mediante precipitazione con i sali (solfato di ammonio, solfato di sodio, acetato di sodio).
4. **Precipitazione**. Avviene di solito in alcool etilico o isopropanolo e permette il recupero degli acidi nucleici in forma solida. Dopo lavaggio con etanolo, si ha una valutazione quali-quantitativa degli acidi nucleici estratti e quindi la loro conservazione.

In alternativa ai metodi di estrazione precedentemente citati (metodo classico

fenolo/cloroformio e metodo *salting out*), esistono in commercio numerosi kit di isolamento e purificazione, molti dei quali basati sull'utilizzo di matrici silicee. Si sfrutta in questo caso la tendenza del DNA ad adsorbirsi alla matrice silicea in presenza di alte concentrazioni di sali caotropici, in particolare idrocloruro e isotiocianato di guanidina. La eluizione degli acidi nucleici si ottiene variando la forza ionica ed il pH della soluzione, utilizzando acqua distillata od un tampone a bassa concentrazione.

5.3 VALUTAZIONE QUALITA' DNA TOTALE ESTRATTO, MISURAZIONE SPETTROFOTOMETRICA

La valutazione quali-quantitativa del DNA estratto viene effettuata per via spettrofotometrica su un'aliquota del campione. Per una stima quantitativa si valuta l'assorbanza a 260 nm del campione mentre per la valutazione qualitativa si prendono in considerazione i valori di assorbanza a 230 e 280 nm. Il rapporto fra l'assorbanza a 260 e gli altri due valori fornisce un'indicazione sulla purezza del DNA: un DNA puro dovrebbe avere un rapporto compreso tra 1,8 e 2,0.

La valutazione delle sostanze contaminanti deve essere presa in considerazione al momento della scelta delle procedure successive a cui sarà sottoposta la soluzione contenente gli acidi nucleici; infatti, una contaminazione da proteine o da fenolo produce, da un lato, una sovrastima della concentrazione degli acidi nucleici, dall'altro un disturbo nell'attività degli enzimi che saranno impiegati per le successive analisi (Focà & Lamberti, 2003)

5.4 LA REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI (PCR) (Scialpi & Mengoni, 2008)

“La PCR è coinvolta in quasi tutti i tipi di analisi genomica.. ha avuto conseguenze importanti poiché questa tecnica ha risolto alcuni problemi di laboratorio: la selettività e la quantità di DNA. In qualsiasi esperimento [prima della scoperta della PCR] era difficile selezionare una particolare sequenza poco abbondante di DNA tra centinaia di migliaia di altre sequenze.” Kary Mullis (2003)

La tecnica che ha posto solide fondamenta alla biologia molecolare, permettendo di raggiungere risultati fino a poco prima insperabili anche nel settore delle analisi degli alimenti, è la *Polymerase Chain Reaction* (PCR), ideata da Kary Mullis e colleghi alla

metà degli anni '80. Questa tecnica permette di individuare la presenza di sequenze specifiche in campioni, anche quando le quantità di materiale di partenza sono minime e non in ottime condizioni; una volta scelto il “bersaglio genetico” cui si è interessati è possibile infatti ottenere milioni di molecole identiche di DNA attraverso una reazione di sintesi a catena mediata da una DNA polimerasi che permette l'amplificazione di una specifica sequenza dell'acido nucleico.

Fra gli elementi necessari alla reazione:

- ✓ Due oligonucleotidi a singolo filamento complementari a due regioni che si trovano su filamenti opposti del DNA stampo (**primer**);
- ✓ DNA stampo che contenga la regione da amplificare;
- ✓ DNA Polimerasi termostabile (**Taq DNA Polimerasi**); si tratta di un enzima abituato ad operare ad alte temperature (temperatura ideale 72°C), prodotto dal batterio *Thermus aquaticus*, che vive nelle sorgenti termali.
- ✓ Desossiribonucleotidi trifosfati (dNTP), utilizzati per sintetizzare il nuovo filamento di DNA;
- ✓ MgCl₂, cofattore della DNA Polimerasi;
- ✓ Soluzione tampone (**Buffer**) allo scopo di mantenere la DNA Polimerasi in condizioni ottimali (pH 8-9 a seconda del tipo di Taq).

Attualmente le case produttrici tendono a fornire delle soluzioni di reazione precostituite, alle quali è necessario aggiungere solo il DNA ed i primer (Guidi *et al.*, 2008).

Il processo consiste essenzialmente nel susseguirsi di un certo numero di cicli di amplificazione, ognuno dei quali contiene 3 passaggi a diverse temperature:

1. **Denaturazione**; il DNA stampo viene denaturato ad una temperatura di 95°C per 30-60 secondi ad ogni ciclo di amplificazione. Una temperatura tanto elevata, infatti, riesce a separare le due eliche interrompendo i legami idrogeno esistenti tra le basi azotate dei due filamenti; La Taq Polimerasi non si deteriora particolarmente in quanto in grado di resistere a tale condizione per almeno 30 minuti, a patto che i cicli totali di PCR non siano superiori a 30-35. E' tuttavia opportuno ricordare che, dall'altro lato, temperature troppo basse, così come cicli troppo brevi, potrebbero non essere sufficienti a denaturare la doppia elica, riducendo così l'efficienza della reazione.
2. **Appaiamento (annealing)** dei primer con il DNA stampo a singola elica a una temperatura di circa 55°C per 30-60 secondi (talvolta si preferisce ridurla ulteriormente a 45-48°C); Precisamente, la temperatura di annealing (**Ta**) dipende anzitutto dalla percentuale dei diversi nucleotidi presenti nei primer (maggiore è il

contenuto di Adenina-Timina, minore sarà la T_a poiché ci sono meno legami idrogeno), nonché dalla loro stessa lunghezza (in genere deve essere almeno di 18-28 pb). La *Temperatura di melting* (definita come la temperatura alla quale metà del DNA si trova nello stato a doppia elica, e l'altra metà in quello denaturato), su cui basare quella di annealing, si può facilmente ricavare dalla formula:

$$T_m = [4(G+C)] + 2(A+T)^\circ\text{C}$$

Si rende infatti necessario sottolineare la necessità di utilizzare programmi che consentano un appaiamento dei primer alle relative sequenze complementari di DNA che sia il più specifico possibile, ricordando che, a temperature eccessivamente basse, essi tenderanno ad appaiarsi casualmente, in modo poco specifico; viceversa, a temperature troppo elevate, non si appaieranno per niente. Stesso concetto riguarda il tempo di *annealing*, che non deve essere troppo lungo (appaiamenti a stampi con bassa complementarietà) né troppo corto (rischio che i primer non si appaino). L'appaiamento dei primer è fondamentale per la riuscita della reazione successiva.

3. Estensione (*elongation*) dei primer, da parte della Taq Polimerasi mediante aggiunta di nucleotidi (dNTP) con sintesi di una nuova elica complementare al DNA stampo.

La temperatura utilizzata in questa terza fase è compresa tra 68 e 72°C, in modo che l'enzima possa operare al meglio (in genere riesce ad estendere i primer ad una velocità di circa 100 basi/sec), mentre il tempo di estensione (intorno ai 60 secondi) varia in base alla lunghezza del DNA stampo.

Al termine del primo ciclo è avvenuta la sintesi delle due nuove molecole “figlie” di DNA. Ricominciando il ciclo è possibile ottenerne quattro copie (una per ogni filamento di DNA del ciclo precedente), e così via in maniera esponenziale per ogni ciclo successivo (generalmente, la Taq Polimerasi è in grado di eseguire 20-30 cicli senza riduzione sensibile dell'efficienza). Nella pratica tuttavia, il numero di copie che si ottiene durante un'amplificazione si ferma al raggiungimento di un plateau ed è calcolabile con la formula $N = (1+e)^n$, dove “e” rappresenta l'efficienza (valore che si ottiene sperimentalmente; dovrebbe aggirarsi intorno allo 0.7-0.8), e “N” il numero di cicli di amplificazione.

I cicli sono realizzati in modo automatico all'interno di uno strumento chiamato **termociclatore**, che esegue automaticamente i cambi di temperatura necessari.

5.4.1 Applicazioni alternative della tecnica di PCR

La PCR è una tecnica molto rapida e flessibile, e ciò ha permesso la realizzazione, negli ultimi anni, di un cospicuo numero di varianti dello schema di base, applicabili nei più svariati settori della ricerca.

Un'evoluzione della PCR è rappresentata dalla **multiplex PCR**, dove più coppie di primers vengono utilizzate per amplificare simultaneamente differenti sequenze nella stessa reazione. Il vantaggio di questo metodo è il considerevole risparmio di sforzi e tempo quando si analizzano differenti regioni bersaglio. Tuttavia, questa metodica può essere restrittiva dal momento che tutte le coppie di primers devono funzionare nelle stesse condizioni di amplificazione, con il rischio che si possa avere formazione di primer-dimer tra vari primer con conseguente diminuzione della sensibilità del test e/o amplificazione preferenziale di alcuni bersagli rispetto ad altri (Markoulatos *et al.*, 2002).

Un miglioramento della metodica PCR si è avuto con l'introduzione della **Real Time PCR**, che consente di seguire l'aumento della quantità di prodotto PCR ad ogni ciclo di amplificazione e quindi di realizzare un'analisi quantitativa dello stampo iniziale basandosi sull'uso di coloranti fluorescenti che si legano al DNA in modo aspecifico o di sonde marcate complementari a specifiche sequenze (Scialpi & Mengoni, 2008).

Nella **PCR-RFLP** (*Restriction Fragments Length Polymorphism*) l'amplificazione mediante PCR è seguita da digestione con endonucleasi (enzimi di restrizione) in grado di tagliare il DNA in siti specifici detti "siti di restrizione" dando origine a segmenti di DNA di lunghezza caratteristica che fungono da markers specie-specifici. La RFLP di amplificati ottenuti con la PCR permette l'identificazione di specie tassonomicamente vicine e morfologicamente simili, in quanto consente di rilevare anche lievi variazioni (polimorfismi) del tratto di DNA amplificato. Queste anche minime differenze determinano il taglio del materiale genetico da parte degli enzimi di restrizione in punti differenti, creando una serie di frammenti di lunghezza diversa (Guidi *et al.*, 2008).

5.4.2 Modificazioni chimiche del DNA negli alimenti

Il DNA estratto da matrici alimentari è spesso molto degradato e quindi presente in piccole quantità in seguito ai trattamenti subiti durante la lavorazione. Per questo motivo la possibilità di poter identificare ed amplificare mediante PCR tale DNA in modo corretto diminuisce drasticamente rispetto a DNA estratti da matrici non lavorate. La lavorazione industriale dei prodotti alimentari, infatti, comporta spesso processi caratterizzati da trattamenti termici (cottura, sterilizzazione, pastorizzazione), alte pressioni, modificazioni del pH, irradiazioni e reidratazioni, che possono alterare notevolmente la stabilità della

molecola di DNA. Bauer *et al.* (2003) hanno ad esempio evidenziato come durante il trattamento a caldo nella preparazione del tofu dalla soia, i frammenti di DNA individuabili erano inferiori alle 1.000 bp. La temperatura rappresenta tuttavia un elemento trascurabile rispetto ad altri fattori, quali eventuali enzimi degradativi presenti negli ingredienti, o le condizioni chimiche a cui avviene il processamento, che possono accelerare la degradazione del DNA, tra cui il pH risulta essere uno dei parametri più influenti. Lindahl & Nyberg (1972) hanno dimostrato che il grado di depurinazione del DNA aumenta fortemente con la riduzione del pH; poiché la depurinazione è una delle principali reazioni iniziali che portano alla rottura del filamento di DNA, si può affermare che l'incremento del grado di rottura, così come la conseguente degradazione del DNA, a pH 4 è ampiamente dovuta alla reazione di depurinazione per catalisi acida (Lindahl & Nyberg, 1972). A conferma di ciò, altri studi hanno dimostrato che nei prodotti a base di pomodoro, come il ketchup, si trovavano frammenti di DNA con lunghezza media inferiore a 400 bp (Hemmer, 2002). Una rottura del DNA dipendente dal pH è stata osservata anche durante la produzione dei prodotti da forno ed in prodotti della pesca marinati (Moser *et al.*, 1999; Armani *et al.*, 2012).

5.4.3 Contaminanti e inibizione della PCR

Al di là dei processi di degradazione, esistono casi in cui l'efficienza delle tecnologie molecolari può venire meno a causa della presenza di determinate sostanze ad azione inibitrice coestratte insieme al DNA. Tale fenomeno rappresenta uno dei principali problemi nelle successive analisi del campione e soprattutto nella reazione della PCR, in quanto queste sostanze sono in grado di ridurre, o addirittura bloccare, la capacità di amplificazione degli acidi nucleici (Lantz *et al.*, 2000). Si tratta di contaminanti originariamente presenti nel campione o derivati dai successivi processi di manipolazione e preparazione dello stesso, o addirittura da entrambe le fonti (Rossen *et al.*, 1992). La letteratura riporta quali principali sostanze inibitrici i sali biliari nelle feci, i polisaccaridi complessi nelle feci e nei campioni vegetali, gli acidi umici nel suolo e nei campioni vegetali, il collagene nei tessuti, l'emoglobina e le immunoglobuline nel sangue, la mioglobina nei tessuti muscolari, l'urea nelle urine, le proteinasi e gli ioni calcio nel latte (Rådström *et al.*, 2004). Un'altra importante causa di inibizione della reazione di PCR è data dai composti che vengono in contatto con il DNA durante le fasi di preparazione del campione: tra questi, si ricordano il Cloruro di Sodio o di Potassio (utilizzati in eccesso), i detergenti ionici come il Sodio desossicolato, sarkosyl e SDS (Weyant *et al.*, 1990), l'etanolo e l'isopropanolo (Loffert, 1997), il fenolo (Katcher & Schwartz, 1994). I più

importanti inibitori del DNA delle matrici alimentari comprendono i composti organici e fenolici, i polisaccaridi, il glicogeno, i grassi, il collagene, i metalli come ferro e cobalto (Wilson, 1997), eventuali residui di cellule batteriche e qualsiasi DNA estraneo all'analisi. I meccanismi inibitori da parte delle suddette sostanze sono essenzialmente tre (Wilson, 1997):

1. **Inattivazione della DNA polimerasi:** da parte di enzimi proteolitici, denaturanti e composti fenolici presenti nel campione. E' stato ad esempio dimostrato che le proteasi dei formaggi sono in grado di inattivare la Taq polimerasi (Rossen *et al.*, 1992), così come la presenza di eventuali proteasi e nucleasi di origine batterica (Wilson, 1997). In questo caso, si può ricorrere all'uso di sostanze in grado di inibire le proteinasi o, soprattutto, alla Siero Albumina Bovina (BSA), che riduce il grado di inibizione della polimerasi fornendo un substrato alternativo alle proteasi. (Powell, 1994).
2. **Degradazione o cattura degli acidi nucleici:** la degradazione è essenzialmente imputabile a fenomeni di idrolisi, metilazione non enzimatica, danno ossidativo e degradazione enzimatica (Lindahl, 1993). La cattura, invece, può avvenire ad opera di cellule batteriche, detriti, proteine e polisaccaridi, che possono rendere il DNA bersaglio inutilizzabile da parte della polimerasi attraverso blocchi o sequestri aspecifici; si pensi a tal proposito alle proteine del latte, che tendono a formare complessi ad alto peso molecolare con il DNA, limitando quindi le possibilità di azione della polimerasi (Rijpens *et al.*, 1996).
3. **Interferenza con i processi di lisi cellulare:** Affinchè l'amplificazione vada a buon fine è assolutamente necessaria una corretta esposizione degli acidi nucleici a seguito della lisi delle membrane cellulari; talvolta il processo litico della parete/membrana cellulare potrebbe non essere sufficiente a determinare una corretta liberazione del DNA ed è quindi necessario ricorrere all'uso di enzimi specifici (Wilson *et al.*, 1997). I composti fenolici eventualmente presenti nel campione, d'altro canto, potrebbero a loro volta interferire con la reazione denaturando i suddetti enzimi litici (Jacobsen & Rasmussen, 1992).

Per far fronte al problema degli inibitori, a livello laboratoristico è possibile ricorrere ad alcuni accorgimenti in grado, se non di ottimizzare le tecniche analitiche, quantomeno di limitare i danni apportati da tali sostanze. Il DNA estratto può infatti essere diluito prima dell'amplificazione, in modo da ridurre anche la concentrazione degli inibitori; può inoltre essere aggiunta alla soluzione di reazione una quantità maggiore di *Taq*, in modo da far sì che una parte di molecole dell'enzima leghino gli inibitori rimuovendoli dalla reazione,

mentre altre rimangono libere per agganciare i primer; ancora, può risultare utile ricorrere all'utilizzo di polimerasi diverse dalla *Taq* classica quali come ad esempio la *Klein Taq*; infine, come precedentemente accennato, oltre è alla sieralbumina bovina (BSA) è possibile inserire in soluzione particolari additivi in grado di contrastare l'azione delle sostanze inibitrici, quali dimetilsolfossido (DMSO), dimetilformamide (DMF), urea, formammide, glicerolo, polietilenglicole (PEG) (Scialpi *et al.*, 2008).

5.4.4 Elettroforesi

L'analisi della PCR è solitamente effettuata mediante corsa elettroforetica che permette di riconoscere i frammenti amplificati in base alla dimensione attesa nota, poiché determinata dalla sequenza compresa tra i due primer utilizzati.

Questo è possibile poiché la PCR produce un numero di copie del frammento di interesse sufficientemente alta da essere visibile ad occhio nudo se legato ad una molecola colorata o fluorescente.

L'elettroforesi è un processo elettrocinetico nel quale molecole e particelle cariche, in soluzione acquosa, sotto l'influenza di un campo elettrico, migrano in direzione del polo che ha la carica opposta (Mathews *et al.*, 2004). In campo biologico sono molte le molecole che possiedono gruppi ionizzabili (come aminoacidi, proteine e acidi nucleici) e quindi, a ogni valore di pH, sono presenti in soluzione come specie elettricamente cariche. Grazie alla presenza di gruppi fosfato le molecole di DNA sono cariche negativamente e quindi, se sottoposte ad un campo elettrico, migrano verso il polo positivo.

Fondamentalmente, qualsiasi apparecchiatura per elettroforesi è strutturata in due componenti principali:

1. Un alimentatore;
2. Una camera di separazione, che è la parte principale dello strumento e può essere realizzata in molti modi differenti.

Nel caso delle molecole biologiche, come acidi nucleici e proteine, è particolarmente indicata la separazione elettroforetica su mezzo stabilizzante come poliacrilammide o gel di agarosio. L'agarosio è un polisaccaride preparato per purificazione dell'agar, che per riscaldamento e successivo raffreddamento forma un gel solido la cui struttura porosa ricorda i fori di un setaccio. A seconda della concentrazione dell'agarosio i pori del gel sono più o meno grandi: le molecole di DNA passano attraverso i pori del gel e, a seconda della propria lunghezza, percorrono una distanza più o meno lunga.

La velocità di migrazione dipende da più fattori, tra cui la **dimensione del DNA** (molecole grandi migrano lentamente, molecole piccole migrano velocemente) e la sua

conformazione (la forma superavvolta corre più veloce perché più compatta; quella circolare corre più lenta perché più ingombrante; quella lineare corre ad una velocità intermedia tra le due precedenti) del DNA, la **concentrazione di agarosio** nel gel (i pori del gel hanno dimensione diversa a seconda della concentrazione utilizzata), il **voltaggio** applicato (circa 5 Volt/cm) e la **composizione del buffer**.

Per consentire la visualizzazione degli acidi nucleici migrati si possono utilizzare diversi tipi di coloranti; quello più usato in assoluto è il bromuro d'etidio. Questa molecola planare si inserisce tra le basi dell'acido nucleico a doppio filamento, ed emette luce fluorescente quando irradiata con luce ultravioletta (300 nm).

E' una sostanza cancerogena, pertanto va maneggiata con cautela, usando i guanti e operando sotto cappa se si adoperano le polveri. Per questo motivo sono stati recentemente sviluppati altri tipi di colorazioni utilizzano: Gel Red, sali di argento, blu di metilene.

5.4.5 Purificazione dei prodotti PCR

La completa rimozione di primer, nucleotidi non incorporati, sali ed enzimi dai prodotti PCR è essenziale per il buon esito degli esperimenti successivi (sequenziamento, analisi di restrizione ecc.). Per purificare i prodotti della PCR sono disponibili in commercio appositi kit, in formato spin-column, per il legame reversibile di DNA a microsfere di vetro, a matrici in silica-gel o matrici in Sephacryl (Guenzi, 2000). L'acido nucleico si lega infatti in modo specifico alla superficie delle fibre di vetro o dei materiali di silice, oppure ad altre speciali matrici in presenza di sali caotropici. La reazione di legame ha luogo in pochi secondi a causa della rottura (dovuta a tali sali) della struttura organizzata dell'acqua che circonda le molecole di DNA. Rompendo l'interazione DNA-acqua, viene favorito l'assorbimento e, dato che il processo è specifico per gli acidi nucleici, il materiale legato viene facilmente separato da proteine, sali e nucleotidi liberi con un semplice passaggio di lavaggio. Il processo richiede una lunghezza minima del DNA (di circa 100-120 bp) in maniera tale che gli oligonucleotidi, ma anche i primer dimerizzati (di 40-80 bp) siano anch'essi rimossi. Le spin-column consentono in genere una rimozione del 90-99% dei contaminanti ed un recupero del 90-95% dei frammenti di DNA di dimensioni variabili a seconda del tipo di matrice utilizzata (compresi tra 300 bp e 5-20 kp). Il tempo della procedura di purificazione è di circa 5-15 minuti (Guenzi, 2000).

5.5 SEQUENZIAMENTO DEL DNA ED ANALISI FILOGENETICA

Le metodiche citate finora consentono esclusivamente di confermare o escludere la presenza delle specie delle quali si conoscono le sequenze da analizzare. Per questo motivo, nel caso in cui la sequenza risulti sconosciuta, è necessario ricorrere al sequenziamento attraverso una tecnica conosciuta come *Forensically Informative Nucleotide Sequencing* (FINS) (Barlett & Davidson, 1991). Questa tecnica è stata ampiamente utilizzata nel comparto ittico per l'identificazione di numerose specie (Espineira *et al.*, 2008; Pepe *et al.*, 2007; Lago *et al.*, 2012). Il sequenziamento del DNA permette infatti di ottenere l'ordine in cui sono disposti i nucleotidi in un preciso tratto del genoma. La reazione di sequenziamento ad oggi maggiormente utilizzata nei laboratori è quella basata sul metodo di Sanger, nel quale è prevista un'ulteriore amplificazione del frammento d'interesse con quella che viene definita "PCR di sequenziamento". Questa differisce da una PCR classica in quanto vengono utilizzati dei dideossinucleotidi marcati (ddNTP) con quattro fluorocromi differenti. L'incorporazione di tali ddNTPs interrompe l'azione della polimerasi, portando alla formazione di una molecola di DNA fluorescente. Infatti, la mancanza di un secondo gruppo idrossilico nel ddNTP in posizione 3' non permette la formazione di un legame fosfodiesterico fra questo e l'atomo di carbonio in posizione 5' del nucleotide successivo. L'incorporazione casuale dei ddNTP fa sì che alla fine della reazione, invece di ottenere molecole della stessa lunghezza, si ottengono frammenti di diversa lunghezza a seconda ddNTP che è stato incorporato. La lettura attraverso un fascio laser dei prodotti di amplificazione produrrà dei picchi di differente lunghezza d'onda per ogni dideossinucleotide-fluorocromo. L'altezza di un picco dipende dall'intensità con cui un gruppo di molecole risponde all'eccitazione laser. La successiva lettura dei picchi permette di risalire all'esatta disposizione dei nucleotidi sulla sequenza (Sanger *et al.*, 1977).

Una volta ottenute le sequenze queste possono essere utilizzate per una successiva analisi filogenetica.

5.5.1 Concetto di filogenesi

Le variazioni molecolari, che sono il presupposto fondamentale per l'evoluzione biologica, hanno avuto origine nel tempo in seguito ad errori nella replicazione del DNA e in base a mutazioni accidentali dovute a fattori esterni, quali quelli climatici o territoriali. La filogenetica molecolare studia le relazioni evolutive gerarchiche tra organismi (detti anche taxa) utilizzando, appunto, dati molecolari. Queste relazioni sono tipicamente descritte attraverso alberi filogenetici, o filogenie, rappresentanti le relazioni evolutive di un insieme

di organismi a partire dalla conoscenza delle loro sequenze molecolari (tipicamente DNA o proteiche) (Felsenstein, 2004). Un albero filogenetico è un grafico costituito da rami nodi e foglie, dove le foglie sono etichettate con le specie o le sequenze note che si vogliono confrontare, mentre i rami ed i nodi definiscono le relazioni tra i taxa. I metodi più comunemente utilizzati per costruire alberi filogenetici sono basati su algoritmi di clustering e si sviluppano a partire da una definizione di distanza tra sequenze (per questo motivo sono anche detti *metodi-distanza*). I metodi basati sulla distanza identificano l'albero che dispone correttamente le sequenze “vicine” (sono dette “vicine” le due sequenze che hanno distanza minore) e che ha la lunghezza dei rami proporzionale alle distanze. I più famosi sono il (N-J) *Neighbor-joining* (utilizzato nel presente lavoro) e l'UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) (Tamura *et al.*, 2004).

CAPITOLO 6

MATERIALI E METODI

6.1 RACCOLTA DEI CAMPIONI DI MEDUSA, MISURAZIONE DEL PH E QUANTIFICAZIONE ALLUMINIO

6.1.1 Campioni di riferimento

Campioni di tessuto conservati in etanolo, essiccati o liofilizzati, provenienti da esemplari identificati a livello di genere o di specie sulla base delle caratteristiche morfologicamente, sono stati gentilmente forniti da Istituti di Ricerca e Musei. Inoltre, alcuni campioni di tessuto sono stati prelevati direttamente da esemplari freschi raccolti lungo le coste tirreniche da Maggio a Settembre 2010. In totale sono stati raccolti 54 campioni appartenenti a 5 famiglie di *Rhizostomeae* (*Cassiopidae*, *Catostylidae*, *Cepheidae*, *Lychnorhizidae*, *Rhizostomatidae*) e a 3 Famiglie di *Semaeostomeae* (*Cyaneidae*, *Pelagiidae*, *Ulmaridae*), identificate (Tab.6.1).

Ordine	Famiglia	Genere Specie	Istituto di Ricerca	n. campioni	Area di provenienza
Rhizostomeae	Catostylidae	<i>Catostylus mosaicus</i>	Australian Museum Sydney Australia	2	Pacific, Southwest FAO 81
			Australian Rivers Institute Griffith School of Environment Gold Coast Campus	1	NR
				2	Pacifico Centro Occidentale FAO 71
	Cassiopidae	<i>Cassiopaea spp.</i>	Dep. of Chemistry, Biology and Marine Science, Faculty of Science, University of the Ryukyus, Okinawa, Japan	1	Pacifico Nord Occidentale FAO 61
			Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover ITZ, Ecology and Evolution Buenteweg, Hannover Germany	1	NR
		<i>Cassiopaea andromeda</i>	National Center for Mariculture Israel Oceanographic and Limnological Research Eilat, Israel	1	Oceano Indiano Occidentale, FAO 51.1
	Cepheidae	<i>Cotylorhiza tuberculata</i>	Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía, ICMAN (CSIC) Puerto Real, Cadiz	4	Mediterraneo Occidentale FAO 37-1.1
			Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover ITZ, Ecology and Evolution Buenteweg, Hannover Germany	1	NR
	Lychnorhizidae	<i>Lychnorhiza lucerna</i>	Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Brasil	5	Atlantico Sud-Occidentale FAO 41 2.1
	Rhizostomatidae	<i>Rhizostoma pulmo</i>	"FISHLAB" Dip. Scienze Veterinarie Università di Pisa	4	Mediterraneo Occidentale FAO 37-1.3
			Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía, ICMAN (CSIC) Puerto Real, Cadiz	6	Mediterraneo Occidentale FAO 37-1.1
		<i>Nemopilema nomurai</i>	Japan Sea National Fisheries Research Institute, Fisheries Research Agency, Niigata, Japan	8	Pacifico Nord Occidentale FAO 61
		<i>Rhopilema esculentum</i>	Ocean University of China. Fisheries of College. Qingdao, China	2	Pacifico Nord Occidentale FAO 61
			"FISHLAB" Dip. Scienze Veterinarie Università di Pisa	2	
			Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima, Japan	2	
		<i>Rhopilema nomadica</i>	Israel Oceanographic and Limnological Research National Center for Mariculture Eilat, Israel	1	Mediterraneo Occidentale FAO 37-3.2
			Department of Marine Biology, University of Haifa, Israel	2	
Semaeostomeae	Cyaneidae	<i>Cyanea lamarckii</i>	Institute of Coastal Research Marine Bioanalytical Chemistry Geesthacht, Germany	2	Atlantico Nord-Orientale FAO 27 Div. IVa
		<i>Cyanea capillata</i>		2	
	Pelagiidae	<i>Pelagia noctiluca</i>	Dipartimento di Biologia, Università di Genova, Genova	3	Mediterraneo Occidentale FAO 37-1.3
			"FISHLAB" Dip. Scienze Veterinarie Università di Pisa	1	
	Ulmaridae	<i>Aurelia aurita</i>	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover ITZ, Ecology and Evolution Buenteweg, Hannover Germany	1	Pacifico Nord occidentale FAO 61

Tab.6.1: Campioni di riferimento morfologicamente identificati raccolti in questo studio.

6.1.2 Prodotti commerciali

70 prodotti a base di medusa sono stati acquistati presso alcuni esercizi commerciali al dettaglio o ristoranti situati all'interno delle principali comunità cinesi italiane (Prato/Firenze, Roma e Milano). Di questi, 22 erano costituiti da prodotti classici in salamoia (PC) (Tab 7.2a) e 48 da prodotti *Ready to eat* (RE). Inoltre, 8 campioni sono stati acquistati direttamente in Cina (Tab 7.2a). Ad ogni prodotto è stato attribuito un codice interno e, successivamente, un'aliquota di tessuto è stata prelevata e stoccata a -20°C.

Codice	Provenienza	Etichettatura	
		Den. commerciale	Den. scientifica
PC-1	Prato / M	Medusa	Rhopilema esculentum
PC-2	Prato / M	Medusa	Rhopilema esculentum
PC-3	Prato / M	Medusa	Rhopilema esculentum
PC-4	Prato / M	Medusa	Rhopilema esculentum
PC-5	Prato / M	Medusa	Rhopilema esculentum
PC-6	Prato / M	Medusa	Rhopilema esculentum
PC-7	Prato / M	Medusa	Rhopilema esculentum
PC-8	Prato / M	Medusa	Rhopilema esculentum
PC-9	Prato / M	Medusa	Rhopilema esculentum
PC-10	Firenze/M	Medusa	Rhopilema esculentum
PC-11	Roma / M	Medusa	---
PC-12	Roma / M	---	---
PC-13	Roma / M	Medusa	Rhopilema esculentum
PC-14	Roma / M	Medusa	Rhopilema esculentum
PC-15	Roma / M	Medusa	Rhopilema esculentum
PC-16	Roma / M	Medusa	Rhopilema esculentum
PC-17	Roma / M	Medusa	Rhopilema esculentum
PC-18	Firenze/M	---	---
PC-19	Prato / M	Medusa	Rhopilema esculentum
PC-20	Prato / M	Medusa Asiatica	Rhopilema esculentum
PC-21	Prato / M	Medusa Asiatica	Rhopilema esculentum
PC-22	Prato / M	Medusa Asiatica	Rhopilema esculentum
PC-23	Zhejiang / M	Medusa	---
PC-24	Zhejiang / M	Medusa	---
PC-25	Zhejiang / M	Medusa	---
PC-26	Zhejiang / M	Medusa	---
PC-27	Zhejiang / M	Medusa	---
PC-28	Zhejiang / M	Medusa	---
PC-29	Jangsu / M	Medusa	---
PC-30	Jangsu / M	Medusa	---

Tab 6.2a: Prodotti classici in salamoia (PC) analizzati in questo studio.

Codice	Provenienza	Etichettatura	
		Den. commerciale	Den. scientifica
RE-1	Prato / M	Bamboo	---
RE-2	Prato / M	Bamboo	---
RE-3	Prato / M	Medusa	Rhopilema esculentum
RE-4	Prato / M	Medusa	Rhopilema esculentum
RE-5	Milano / M	Medusa	Rhopilema esculentum
RE-6	Milano / M	Medusa	Rhopilema esculentum
RE-7	Milano / M	Medusa	Rhopilema esculentum
RE-8	Prato / M	Tubero di senape	---
RE-9	Prato / M	Tubero di senape	---
RE-10	Firenze / M	Tubero di senape	---
RE-11	Roma / M	Tubero di senape	---
RE-12	Roma / M	Medusa	Rhopilema esculentum
RE-13	Roma / M	Medusa	Rhopilema esculentum
RE-14	Roma / R	Medusa	---
RE-15	Roma / M	Medusa	Rhopilema esculentum
RE-16	Roma / M	Medusa	Rhopilema esculentum
RE-17	Roma / M	Tubero di senape	---
RE-18	Roma / M	Tubero di senape	---
RE-19	Roma / M	Medusa	Rhopilema esculentum
RE-20	Firenze / M	Medusa	Rhopilema esculentum
RE-21	Firenze / M	Medusa	Rhopilema esculentum
RE-22	Firenze / M	Medusa	Rhopilema esculentum
RE-23	Firenze / M	Medusa	Rhopilema esculentum
RE-24	Firenze / R	Medusa	---
RE-25	Prato / M	Medusa	Rhopilema esculentum
RE-26	Prato / M	Medusa	Rhopilema esculentum
RE-27	Milano / M	Medusa	Rhopilema esculentum
RE-28	Milano / M	---	---
RE-29	Milano / M	---	---
RE-30	Milano / M	---	---
RE-31	Milano / M	---	---
RE-32	Prato / M	Medusa	Rhopilema esculentum
RE-33	Prato / M	Medusa	Rhopilema esculentum
RE-34	Prato / M	Medusa	Rhopilema esculentum
RE-35	Prato / M	Medusa	Rhopilema esculentum
RE-36	Prato / M	---	---
RE-37	Prato / M	Tubero di senape	---
RE-38	Prato / M	Giglio d'oro	Hemerocallis fulva
RE-39	Prato / M	Giglio d'oro	Hemerocallis fulva
RE-40	Prato / M	Giglio d'oro	Hemerocallis fulva
RE-41	Prato / M	Medusa	Rhopilema esculentum
RE-42	Prato / M	Medusa	Rhopilema esculentum
RE-43	Prato / R	Medusa	---
RE-44	Prato / R	Medusa	---
RE-45	Firenze/M	Medusa	Rhopilema esculentum
RE-46	Firenze/M	Medusa	Rhopilema esculentum
RE-47	Firenze/M	Tubero di senape	---
RE-48	Firenze/M	Tubero di senape	---

Tab 6.2b: Prodotti Ready to eat (RE) analizzati in questo studio.

6.1.3 Misurazione del pH e dell'Alluminio totale

La misurazione del pH è stata effettuata, utilizzando un pHmetro Eutech 700 (Eutech Instruments Pte Ltd 55, 139949 Singapore) con sonda METTLER TOLEDO 405-60-T-S7/120-9848 (Mettler-Toledo AG, Analytical, CH-8603 Schwerzenbach, Svizzera), sia sulla salamoia che sul liquido di drenaggio ottenuto dopo triturazione con omogeneizzatore Ultraturrax T25 inastato con punta S25-18G (JANKE & LUNKEL GMBH 6CO. KG, IKA-LABORTECHNIK, Staufen Germany), dei tessuti di medusa prelevati da tutti i campioni commerciali (*Tab 6.2a e b*). Inoltre, dieci campioni commerciali (5 PC e 5 RE) sono stati inviati presso una ditta esterna (Laboratori Archa S.r.l., Pisa, Italia) per la determinazione dell'Alluminio totale (*Tab 6.2a e b*).

6.2 ESTRAZIONE DEL DNA TOTALE CON IL PROTOCOLLO STANDARD

6.2.1 Trattamento preliminare

I campioni conservati in etanolo, quelli essiccati e liofilizzati hanno subito un trattamento di lavaggio/reidratazione in Tris-base 100 mM a pH 7,8 per una durata di 30 minuti a temperatura ambiente, in agitazione continua su un agitatore tipo Vortex-Genie®, digital (Scientific industries, Inc. NY, 11716 USA). I prodotti commerciali sono stati invece sottoposti a lavaggio in acqua corrente per 2 h.

6.2.2 Estrazione del DNA totale

L'estrazione del DNA totale è stata condotta a partire circa 20 mg di tessuto, ed è stata effettuata secondo il protocollo proposto da Armani *et al.* (2011a), con alcune modifiche alla fase di digestione che è stata condotta in agitazione continua su termoblocco autoriscaldante (T-shaker Euroclone S.p.A 27010, Siziano, Pavia, Italia) riducendo il tempo di incubazione ad 1h. Nel caso dei prodotti commerciali, sono state raccolte 5 aliquote di tessuto per ogni campione. Di seguito sono riportati le soluzioni e i reagenti utilizzati e le fasi del protocollo estrattivo in forma schematica.

Soluzioni e reagenti:

Buffer di Lisi: Tris base 500 mM , EDTA 100 mM,, NaCl 100mM, SDS 2%

Tampone Fosfato: NaH₂PO₄ 300mM pH 8.0

Proteinasi K 20mg/ml

Acetato di Sodio 4 M pH 8.3

Isopropanolo puro

Etanolo 70%, 100%

Protocollo estrattivo:

- 1) Preparazione del campione e lisi meccanica: in una provetta da 2 ml sono stati aggiunti 100 µl di buffer di lisi, 100 µl di NaH₂PO₄ e 10 µl di proteinasi K 20 mg/ml ogni 100 mg di tessuto. Il tessuto è stato poi finemente sminuzzato con forbici;
- 2) Digestione enzimatica: i campioni omogenati sono stati posti in agitazione continua su termoblocco per 1h a 60°C; a termine del periodo di incubazione il digesto è stato centrifugato a 15-16000x g per 2' per separare il surnatante liquido dai detriti cellulari;
- 3) *Salting out* delle proteine: misurato il volume, la fase liquida è stata trasferita in una nuova provetta da 2 ml e sono stati aggiunti 0,5 volumi di Acetato di sodio 4M; il campione è stato poi mescolato, lasciato a RT (temperatura ambiente (RT) per 5' e infine centrifugato a 15-16000x g per 5';
- 4) Precipitazione del DNA: il volume del surnatante è stato raccolto e misurato; sono poi stati aggiunti 0,6 volumi di isopropanolo; il campione è stato poi mescolato, lasciato a RT per 10' ed infine centrifugato nuovamente a 15-16000x g per 10';
- 5) Lavaggio del DNA e allontanamento dei Sali residui: il surnatante è stato allontanato per inversione della provetta ed il *pellet* di DNA è stato lavato con Etanolo al 70%; il campione è stato poi centrifugato a 15000x g per 5'. E' stato poi effettuato un ciclo di lavaggio finale con Etanolo al 100%;
- 6) Asciugatura e solubilizzazione del DNA totale estratto: le provette sono state poste in stufa a 50-70 °C per far evaporare l'etanolo residuo prima di risospendere il *pellet* in H₂O deionizzata sterile (Molecular grade DNasi,-RNasi, proteasi free).

6.3 QUANTIFICAZIONE SPETTROFOTOMETRICA E VALUTAZIONE DELL'INTEGRITA' DEL DNA TOTALE MEDIANTE ELETTROFORESI SU GEL D'AGAROSIO

6.3.1 Misurazione della concentrazione del DNA estratto

La quantità di DNA è stata valutata attraverso uno spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, US), misurando l'assorbanza a 260 nm. Il grado di purezza del DNA è stato valutato in base al rapporto di assorbanza a 260/280 nm ed a 260/230 nm.

6.3.2 Elettroforesi del DNA totale su gel d'Agarosio

1 µg di DNA totale estratto dai campioni commerciali e dai campioni freschi di *Rhizostoma pulmo* (controllo positivo) sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio 1% (GellyPhorLE® Euroclone, Life Sciences Division PV, Italia), colorati con GelRed™ Nucleid Acid Gel Stain 10000X w. solution (Biotium, Hayward, CA, USA) ed osservati tramite transilluminazione UV. Il livello di frammentazione del DNA è quindi stato valutato tramite comparazione con i marker molecolari Standard SharpMass™ 50DNA ladder e SharpMass™ 1-DNA ladder (Euroclone, Life Sciences Division, PV, Italia).

6.4 ANALISI DELLE SEQUENZE DI RIFERIMENTO, DISEGNO DEI PRIMER E OTTIMIZZAZIONE DEL PROTOCOLLO DI PCR PER L'AMPLIFICAZIONE DEL FRAMMENTO DI FOLMER DEL GENE MITOCONDRIALE COI

6.4.1 Disegno dei primer

Le sequenze di riferimento del gene *COI* (JN700940; JN700934; JN700936; JN700988; JN700937; JN700941; JN700949; GQ120101; HQ694729) sono state scaricate da GenBank. Queste sono state poi allineate con i primers universali LCO1490 e HC02198 disegnati da Folmer *et al.* (1994) (*Fig 6.1*), con il programma Clustal W in MEGA versione 5.10 (Tamura *et al.*, 2011). Sulla base delle transizioni e trasversioni rilevate, sono stati prodotti nuovi primer con nucleotidi degenerati in diverse posizioni. La performance amplificativa di questi nuovi primer degenerati e dei primer universali di Folmer *et al.* (1994) (*Tab 6.3*) è stata quindi testata, in tutte le possibili concentrazioni ed in diverse combinazioni, sulla base del loro grado di degenerazione, sui campioni freschi. La temperatura di annealing ottimale (T_a) è stata determinata usando la funzione gradiente di temperatura sul termociclatore peqSTAR 96 Universal Gradient (Euroclone, Milano, Italia). Ai primers selezionati sono poi state aggiunte le code oligonucleotidiche proposte da Steffens *et al.* (1993) (*Tab 6.3*).

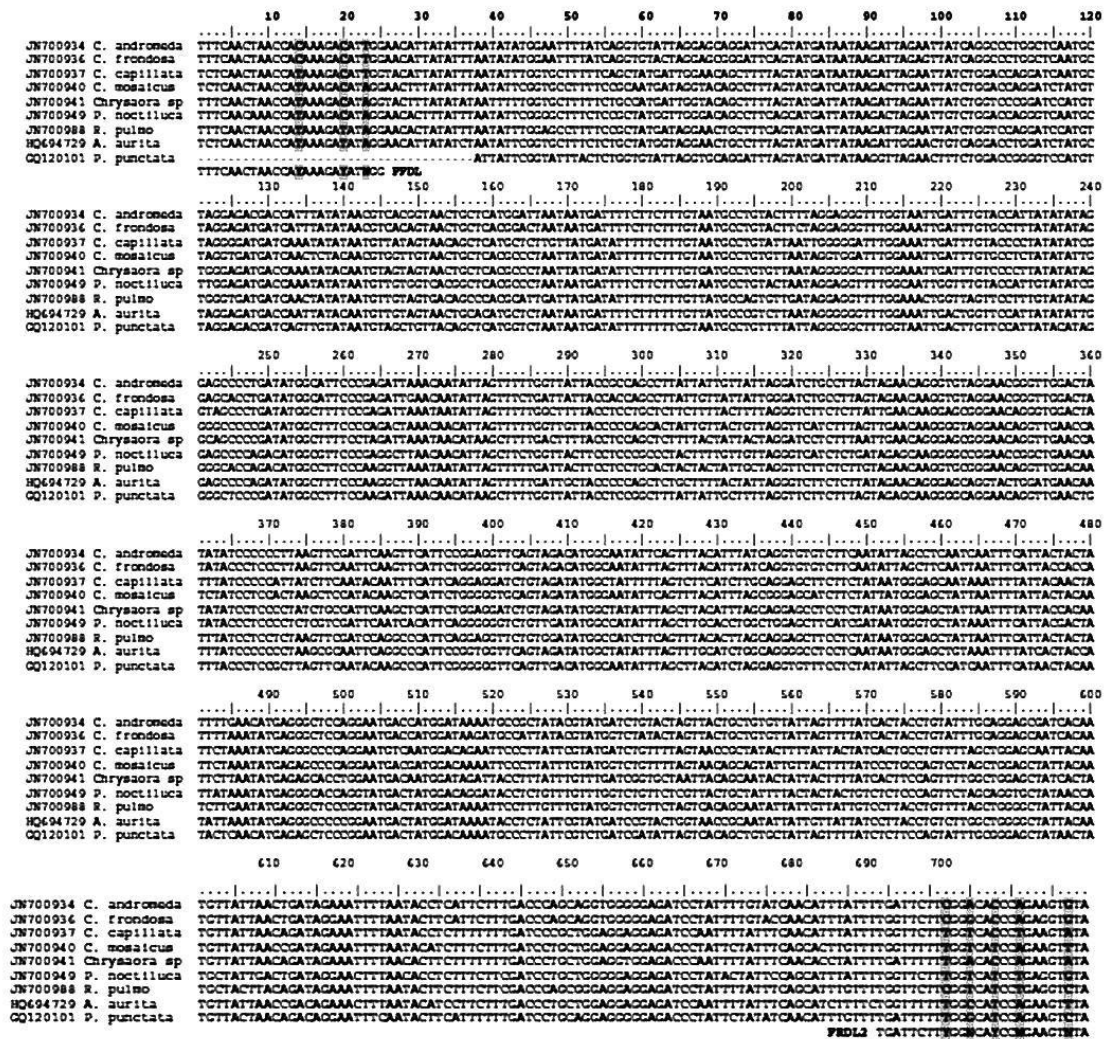


Fig 6.1: allineamento delle sequenze disponibili in Genbank la progettazione dei primer FFDL, FRDL2 per l'amplificazione del frammento del gene mitocondriale COI individuato da Folmer et al.1994 . La posizione delle basi degenerate inserite all'interno dei primer prodotti è stata evidenziata in grigio su ciascuna sequenza di riferimento.

Codice primer	Descrizione - Autori riferimento	Primer sequence (5'→3')	Lungh. (bp)	TM (°C)	Lunghezza dell'amplicone con/senza Primer
LCO1490	Folmer, 1994	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	25	56,4	709/658
HCO2198		TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	26	58,5	
FDF	Presente studio Modificati da Folmer	TCAACAAACCAYAAAGATATWGG	23	54,4	
FDR		CTTCTGGGTGNCRAARAAYCA	22	60,2	
FRDL		TAAACTTCTGGGTGNCRAARAAYCA	26	61,6	
FFDL		TTTCAACTAACCAYAAAGAYATWGG	25	56,4	
FRDL2		TANACTTCWGGRTGNCRAAGAATCA	26	61,6	
REV514	Presente studio Primer Reverse interni	CCATAGTCATTCCDGGDGC	19	58,1	514/469
REV514N		CCATNGTCATWCCDGGDG	18	56,3	
REV514A		TCCATNGTCATWCTGGRGC	20	59,3	
REV514B		TCCATNGTCATWCTGGRGCYCTC	24	65,3	
REV256A		GCCATRTCYGGDGTCTATATAAA	25	61,9	256/206
REV256B		GCCATATCNGGACTACCAATATATA	25	58,9	
REV193W		GGCATWACRAAGAARAATATCATTAT	26	55,3	193/145
REV193H		GGCATHACRAAGAARAATATCATTAT	26	55,9	
REV193HS		GGCATHACRAAGAARAATATCAT	23	54,1	
REV163		GCRTGDGCTGTBACAACCAC	20	60,4	163/118
REV133		TGRTCRICWCCTARCATAGATCC	23	59,8	133/85
M13F	Steffen et al 1993	CACGACGTTGTAAAACGAC	19		
M13R		GGATAACAATTCACACAGG	20		

Tab 6.3: Primer sviluppati in questo studio per l'amplificazione del frammento di Folmer e dei frammenti interni. Quelli selezionati per i protocolli di amplificazione sono evidenziati in azzurro. (tratto da: Armani *et al.* 2013 doi:10.1016/j.foodres.2013.10.003)

6.4.2 Utilizzo della Siero Albumina Bovina (BSA)

La siero-albumina bovina (BSA) è stata testata a differenti concentrazioni finali (200, 100, 50, 25 e 0 ng/ml) al fine di selezionare la concentrazione capace di migliorare la performance di amplificazione.

7.4.3 Protocollo di amplificazione, sequenziamento ed analisi delle sequenze dei campioni freschi.

Tutto i campioni di DNA ottenuti dai campioni freschi sono stati amplificati utilizzando 20 µl di volume finale di reazione contenente: 2 µl di buffer 10x (5Prime, Gaithersburg, USA), 200 µM di ogni dNTP, 300 nM di primers, 25 ng/µL di BSA, 1,25 U di PerfectTaq DNA Polymerase, 100 ng di DNA ed acqua (*DNAse free*) con il seguente programma di amplificazione: denaturazione a 94°C per 3 minuti; 40 cicli a 94°C per 30 secondi, 51°C per 30 secondi, 72°C per 35 secondi; estensione finale a 72°C per 10 minuti. I prodotti di PCR (5 µL) sono stati verificati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1,8% confrontando la lunghezza dei frammenti con la scala dell'indicatore Standard SharpMass TM50-DNA (Euroclone, Life Sciences Division, PV, Italia).

I prodotti di PCR sono stati poi purificati con il kit di purificazione Agencourt® AMPureXP (Beckman Coulter, Beverly, Massachusetts, USA), secondo la procedura riportata dalle istruzioni. I prodotti purificati sono stati sequenziati dalla Ditta BMR

Genomics (Padova, Italia). Le sequenze ottenute sono state analizzate usando il programma Clustal W in MEGA versione 5.10. Le sequenze sono state poi corrette manualmente dopo un'analisi visiva e successivamente sono state controllate per verificare la presenza di pseudogeni nucleari seguendo il protocollo proposto da Song *et al.* (2008). Il confronto con le altre sequenze disponibili nei Databases è stato eseguito attraverso un'analisi BLAST sia su GenBank che su Barcode of Life Database. Inoltre alcune sequenze provenienti da campioni identificati di *R. luteum* sono state recuperate da un lavoro svolto in collaborazione con la Dr.ssa Laura Prieto del *Department of Ecology and Coastal Management*, Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (CSIC), Republica Saharaui 2, 11519, Puerto Real, Cádiz, Spain.

6.5 ANALISI MOLECOLARE DEI CAMPIONI DI DNA DAI PRODOTTI COMMERCIALI

6.5.1 Disegno del primers reverse interni per l'amplificazione del frammento corto del gene COI.

In considerazione del livello di degradazione del DNA evidenziato dall'analisi su gel elettroforetico, abbiamo deciso di disegnare dei primer reverse interni per l'amplificazione di frammenti più corti del gene *COI*, in combinazione con il forward FFDL. A tal fine, le sequenze prodotte in questo studio sono state allineate con quelle recuperate dai Databases pubblici (75 sequenze appartenenti a 14 specie di 5 diverse famiglie di *Rhizostomeae* e 54 sequenze appartenenti ad 11 specie di 3 diverse famiglie di *Semaestomeae*) ed usate per disegnare i primers reverse interni (*Fig 6.2*). I reverse interni disegnati all'interno della sequenza di Folmer (*Tab. 6.3*) sono stati testati su una su tutti i DNA provenienti estratti dagli esemplari morfologicamente identificati. Anche in questo caso i primers selezionati sono stati muniti di una coda oligonucleotidica (Steffen *et al.* 1992) per la standardizzazione del sequenziamento dei prodotti di PCR. I protocolli di amplificazione per i frammenti inferiori a 500bp differiscono da quelli ottimizzati per il frammento di Folmer nella temperatura di annealing e nel tempo di estensione, che sono rispettivamente di 50°C e di 20 secondi.

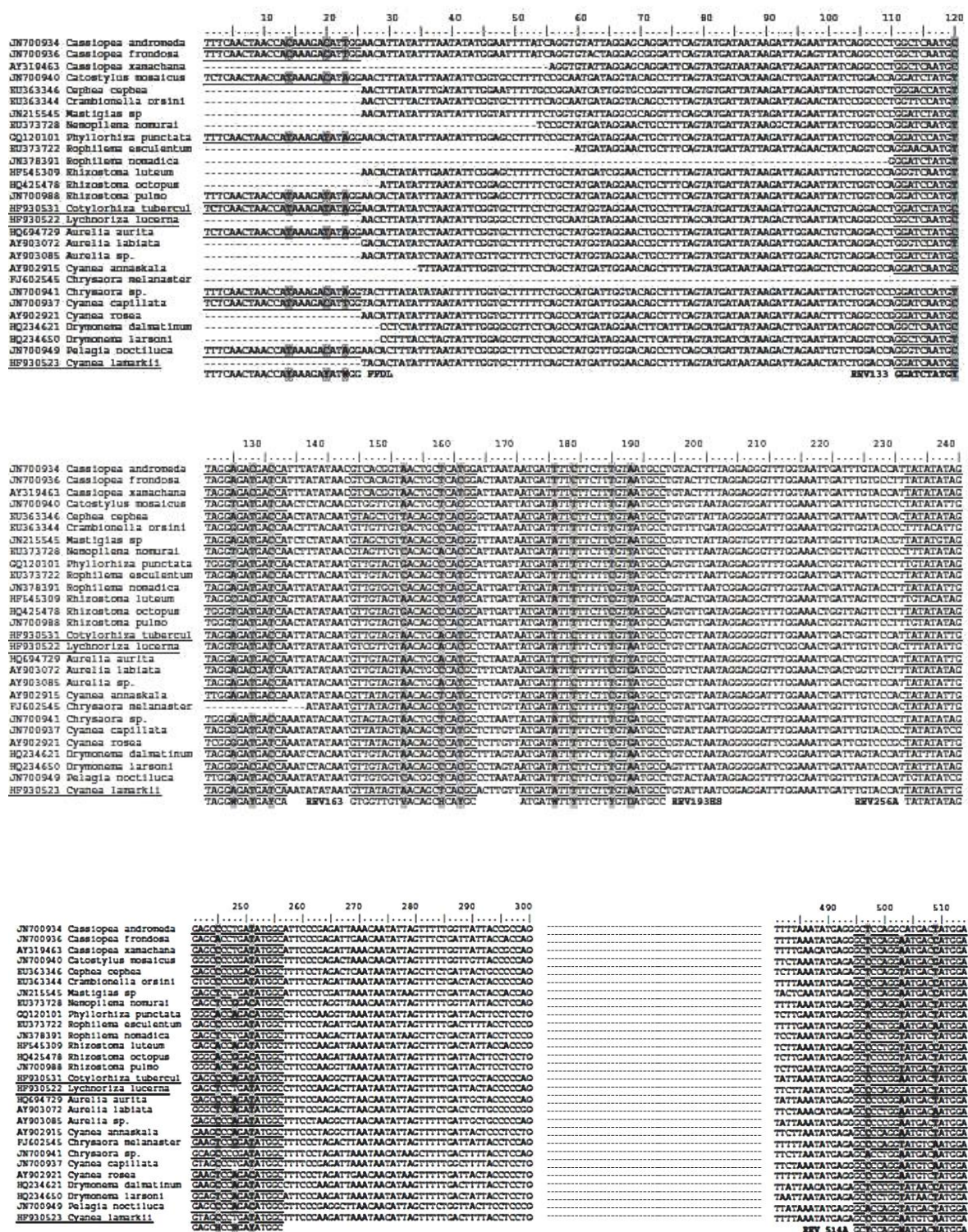


Fig 6.2: allineamento delle sequenze presenti in GenBank per il disegno dei primer interni

6.5.2 Amplificazione del DNA dei prodotti commerciali.

I protocolli sviluppati sono stati utilizzati per l'amplificazione del DNA estratto dai prodotti commerciali, secondo il pattern di frammentazione evidenziato nell'elettroforesi su gel. Anche utilizzando concentrazioni crescenti di DNA (da 100 a 500ng) l'amplicone è stato ottenuto soltanto dal DNA di cinque campioni di RE.

6.5.3 Valutazione degli inibitori della PCR e sviluppo di un metodo per l'estrazione del DNA dai prodotti commerciali

Per valutare la presenza di inibitori della PCR nel DNA estratto dai campioni commerciali di medusa è stato utilizzato il DNA di tre campioni di *N. nomurai* (controllo positivo) insieme a tre campioni di prodotti RE ed altrettanti tre di prodotti PC. In particolare, sono state effettuate le seguenti prove:

- *Test di diluizione seriale:* da ogni campione sono state preparate tre differenti diluizioni (10,1, 0.1 ng/ μ L) in acqua (*DNase free*).
- *Spiking test:* Il DNA estratto da *N. nomurai* è stato diluito con diverse percentuali di DNA estratto da campioni RE e PC (10%, 50% e 100%) e con acqua (*DNase free*) al fine di raggiungere una concentrazione di 100 ng/ μ L.
- *Purificazione del DNA estratto:* Il DNA ottenuto con il metodo di estrazione standard è stato purificato con il kit di purificazione Agencourt[®] AMPure[®] XP PCR Purification (Beckman Coulter, Beverly, Massachusetts, USA) seguendo le istruzioni fornite dalla casa produttrice e, dopo essere stato quantificato, è stata preparata una soluzione di 100 ng/ μ L.

Tutti i campioni preparati sono stati poi amplificati nelle condizioni di PCR precedentemente descritte, tenendo in considerazione il grado di degradazione del DNA.

6.5.4 Sviluppo del metodo per l'estrazione del DNA dai prodotti commerciali

Su dieci prodotti commerciali (cinque RE e cinque PC) sono state testate dei pre-trattamenti pre-estrattivi. I campioni sono stati sminuzzati grossolanamente con delle forbicine e poi trattati in modo diverso secondo il seguente schema:

1. Desalati sotto acqua corrente a temperatura ambiente per 24, 48 o 72 ore;
2. Incubati in quattro diverse soluzioni di EDTA (50,100,200,400 mM) per un'ora a temperatura ambiente nel thermoshaker;
3. Procedure 1 e 2 insieme.

L'estrazione del DNA totale è stata poi effettuata secondo quanto descritto da Armani *et al.* (2011a), partendo da circa 250 mg di tessuto. La quantità di DNA e il grado di

frammentazione sono stati determinati come riportato nei paragrafi 6.3.1 e 6.3.2, infine, tutti i campioni sono stati amplificati secondo le condizioni di PCR descritte nel paragrafo 6.4.3, scegliendo i primers reverse sulla base del livello di degradazione del DNA totale. Per l'analisi dei prodotti commerciali è stata scelta la procedura di pretrattamento n°3, con un tempo di desalatura sotto acqua corrente di 24-48 ore ed un'incubazione in una soluzione di EDTA 400 mM per un'ora a temperatura ambiente.

6.5.5 Protocollo di amplificazione finale, sequenziamento ed analisi delle sequenze dei prodotti commerciali

Il protocollo finale scelto per l'amplificazione dei prodotti commerciali è stato il seguente: volume di reazione di 20 µl totali, contenente 2 µl di buffer PCR 10x (5Prime, Gaithersburg, USA), 200 mM di ogni dNTP, 300 nM di primers, 25ng/ µl di BSA, 100 ng di acqua libera da DNA e DNasi. La concentrazione di della DNA Polimerasi PerfectTaq è stata aumentata a 2,5 U, mentre il programma è stato aumentato a 45 cicli.

Tutti i prodotti commerciali sono stati amplificati secondo le suddette condizioni e controllati tramite corsa elettroforetica, purificati ed inviati ad un laboratorio esterno (BMR Padova) per l'analisi di sequenziamento.

Le sequenze prodotte sono state allineate e corrette manualmente utilizzando il programma Clustal W integrato in MEGA versione 5.10 ed analizzate come riportato nel paragrafo 6.4.3. Le sequenze prodotte sono state quindi depositate in GenBank.

6.5.6 Analisi filogenetica

54 sequenze ottenute dai campioni identificati e 78 sequenze ottenute dai prodotti commerciali sono state allineate con 60 sequenze di meduse (*Tab 6.4*), appartenenti all'Ordine delle *Rhizostomeae* e delle *Semaeostomeae*, recuperate da GenBank, utilizzando il programma Clustal W in MEGA versione 5.10 (tabella dei 3SM da utilizzare qui). Laddove è stato possibile, sono state recuperate dal database cinque differenti sequenze per ogni specie. Solo nel caso di *Aurelia spp.*, genere al quale recenti studi hanno attribuito almeno 14 specie diverse, sono state recuperate più di cinque sequenze (*Tab.6.4*). Per l'analisi filogenetica è stato selezionato un frammento di 142 bp appartenente al gene COI. Il dendrogramma Neighbour-joining (NJ) è stato ottenuto utilizzando il programma MEGA version 5.10 e le distanze sono state calcolate con il modello Kimura 2-parametri con 2000 bootstraps di *re-sampling*.

Family	Species	GenBank AN	Reference
Cassiopeidae	<i>Cassiopea andromeda</i>	JN700934	Kayal, E., Bentlage, B., Collins, A.G., Kayal, M., Pirro, S., & Lavrov, D.V. (2012) Evolution of linear mitochondrial genomes in medusozoan cnidarians <i>Genome Biology and Evolution</i> , 4 (1), 1-12
	<i>Cassiopea frondosa</i>	JN700936	Kayal, E., Bentlage, B., Collins, A.G., Kayal, M., Pirro, S., & Lavrov, D.V. (2012) Evolution of linear mitochondrial genomes in medusozoan cnidarians <i>Genome Biology and Evolution</i> , 4 (1), 1-12
Catostylidae	<i>Crambionella orsini</i>	EU363343-44	Daryanabard, R., & Dawson M. N. (2008) Jellyfish blooms: <i>Crambionella orsini</i> (Scyphozoa: Rhizostomeae) in the Gulf of Oman, Iran, 2002–2003. <i>Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom</i> , 88(3), 477–483
	<i>Crambionella stuhlmanni</i>	HM348770-71-72	Neethling, S., Channing, A., Gershwin L-A., & Gibbons M. J. (2011) A modern description of <i>Crambionella stuhlmanni</i> (Scyphozoa: Rhizostomeae) from St Lucia Estuary, South Africa <i>Journal of Marine Biology Association of the United Kingdom</i> , 91 (2), 357-367
Cepheidae	<i>Cephea cephea</i>	EU363346	Daryanabard, R., & Dawson M. N. (2008) Jellyfish blooms: <i>Crambionella orsini</i> (Scyphozoa: Rhizostomeae) in the Gulf of Oman, Iran, 2002–2003. <i>Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom</i> , 88(3), 477–483
Mastigiidae	<i>Mastigias sp.</i>	JN215544-45-46	Bayha, K.M., & Graham, W.M. (2011) First confirmed reports of the rhizostome jellyfish <i>Mastigias</i> (Cnidaria: Rhizostomeae) in the Atlantic basin. <i>Aquatic Invasions</i> , 6 (3), 361-366
		AY903044-46	Dawson, M.N., & Hamner, W.M. (2005) Rapid evolutionary radiation of marine zooplankton in peripheral environments. <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America</i> 102 (26), 9235-9240
	<i>Phyllorhiza punctata</i>	EU363341-42	Daryanabard, R., & Dawson M. N. (2008) Jellyfish blooms: <i>Crambionella orsini</i> (Scyphozoa: Rhizostomeae) in the Gulf of Oman, Iran, 2002–2003. <i>Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom</i> , 88(3), 477–483
Rhizostomatidae	<i>Rhizostoma octopus</i>	HQ425462-66-70-74-78	Lee, P.L., Dawson, M.N., Neill, S.P., Robins, P.E., Houghton, J.D., Doyle, T.K. & Hays, G.C. (2013) Identification of genetically and oceanographically distinct blooms of jellyfish. <i>Journal of the Royal Society Interface</i> , 10 (80), 1742-5662
	<i>Rhizostoma luteum</i>	HF545309 HF937340-41	Pietro L., Armani A. & Macias D. (2013) Recent strandings of the giant jellyfish <i>Rhizostoma luteum</i> Quoy and Gaimard, 1827 (Cnidaria: Scyphozoa: Rhizostomeae) on the Atlantic and Mediterranean coasts. <i>Marine Biology</i> . DOI 10.1007/s00227-013-2293-6
Cyaneidae	<i>Cyanea annaskala</i>	AY902923	Dawson, M. N. (2005) <i>Cyanea capillata</i> is not a cosmopolitan jellyfish: morphological and molecular evidence for <i>C. annaskala</i> and <i>C. rosea</i> (Scyphozoa, Semaestomeae, Cyaneidae) in southeast Australia. <i>Invertebrate Systematics</i> 19 (4), 361-370
	<i>Cyanea capillata</i>	AY902911	Dawson, M. N. (2005) <i>Cyanea capillata</i> is not a cosmopolitan jellyfish: morphological and molecular evidence for <i>C. annaskala</i> and <i>C. rosea</i> (Scyphozoa, Semaestomeae, Cyaneidae) in southeast Australia. <i>Invertebrate Systematics</i> 19 (4), 361-370
	<i>Cyanea rosea</i>	AY902920-21-22	Dawson, M. N. (2005) <i>Cyanea capillata</i> is not a cosmopolitan jellyfish: morphological and molecular evidence for <i>C. annaskala</i> and <i>C. rosea</i> (Scyphozoa, Semaestomeae, Cyaneidae) in southeast Australia. <i>Invertebrate Systematics</i> 19 (4), 361-370
	<i>Pelagia noctiluca</i>	HE591457	Belinky, F., Szitenberg, A., Goldfarb, I., Feldstein, T., Worheide, G., Ilan, M. & Huchon, D. (2012) ALG11 - A new variable DNA marker for sponge phylogeny: Comparison of phylogenetic performances with the 18S rDNA and the COI gene <i>Molecular Phylogenetics and Evolution</i> , 63 (3), 702-713
Ulmaridae	<i>Aurelia aurita</i>	AY903208-09-10-11-12	Dawson, M.N., Sen Gupta, A., & England, M.H. (2005) Coupled biophysical global ocean model and molecular genetic analyses identify multiple introductions of cryptogenic species <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America</i> , 102 (34), 11968-11973
	<i>Aurelia labiata</i>	AY903068-70-71-72-73	Dawson, M.N., Sen Gupta, A., & England, M.H. (2005) Coupled biophysical global ocean model and molecular genetic analyses identify multiple introductions of cryptogenic species <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America</i> , 102 (34), 11968-11973
	<i>Aurelia sp.</i>	EU010386 EU366143-44	Ki, J.-S., Hwang, D.-S., Shin, K., Yoon, W.D., Lim, D., Kang, Y.S., Lee, Y. and Lee, J.-S. (2008) Recent moon jelly (<i>Aurelia</i> sp. 1) blooms in Korean coastal waters suggest global expansion: examples inferred from mitochondrial COI and nuclear ITS-5.8S rDNA sequences. <i>ICES Journal of Marine Science</i> , 65(3), 443-452
		AY903116-69-85 AY903081-85-88 AY903191-96 AY903131	Dawson, M.N., Sen Gupta, A., & England, M.H. (2005) Coupled biophysical global ocean model and molecular genetic analyses identify multiple introductions of cryptogenic species <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America</i> , 102 (34), 11968-11973
Drymonematidae	<i>Drymonema larsoni</i>	HQ234610-12-18-22-50	Bayha, K.M., & Dawson, M.N. (2010) New family of allomorphic jellyfishes, Drymonematidae (Scyphozoa, Discomedusae), emphasizes evolution in the functional morphology and trophic ecology of gelatinous zooplankton <i>The Biological Bulletin</i> , 219 (3), 249-267
	<i>Drymonema dalmatinum</i>	HQ234615-16-17-21	Bayha, K.M., & Dawson, M.N. (2010) New family of allomorphic jellyfishes, Drymonematidae (Scyphozoa, Discomedusae), emphasizes evolution in the functional morphology and trophic ecology of gelatinous zooplankton <i>The Biological Bulletin</i> , 219 (3), 249-267

Tab.6.4: Sequenze raccolte da GenBank ed utilizzate per l'analisi filogenetica. (tratto da: Armani *et al.* 2013 doi:10.1016/j.foodres.2013.10.003)

CAPITOLO 7

RISULTATI E DISCUSSIONI

Le metodiche molecolari basate sull'analisi del DNA vengono impiegate routinariamente nel comparto ittico per verificare le informazioni di tracciabilità riportate in etichetta e combattere le frodi. Tali metodiche consentono, infatti, di identificare un gran numero di specie diverse, anche in prodotti alimentari trasformati nei quali il DNA potrebbe essere parzialmente degradato (Armani *et al.*, 2012a) o contaminato da potenziali inibitori della PCR (Teletchea, 2009).

I marcatori molecolari più utilizzati sono costituiti da alcuni geni del DNA mitocondriale come il *16srRNA* il *cytb* ed il *COI* (Armani *et al.*, 2012). Nonostante il gene per il *cytb* abbia dimostrato una capacità discriminante nei confronti di specie simili comparabile al *COI* (Armani *et al.*, 2011a; Armani *et al.*, 2012b), quest'ultimo è stato proposto come il gene di riferimento per il Global Bioidentification System (GBS) per tutti gli animali. Pertanto, grazie alla realizzazione di un apposito database (<http://www.boldsystems.org/>), il numero di sequenze *COI* disponibili è notevolmente aumentato e, di conseguenza, vi è maggiore possibilità di abbinare sequenze sconosciute a sequenze già depositate. Negli Scyphozoa il gene *COI* ha mostrato sufficienti livelli di variazione nell'ambito delle diverse specie ed è pertanto stato utilizzato in molti studi per ricostruire la filogenesi della suddetta classe (Dawson, 2005; Ramsak *et al.*, 2012). Per i suddetti motivi il gene *COI* è stato selezionato nel presente studio quale target per sviluppare un metodo molecolare volto all'identificazione delle specie contenute nei prodotti commercializzati in salamoia.

7.1. MISURAZIONE DEL pH E QUANTIFICAZIONE DELL'ALLUMINIO

8.1.1 Misurazione del pH e quantificazione dell'Alluminio

Considerando che l'Allume di Potassio $KAl(SO_4)_2$ viene impiegato nella produzione delle meduse in salamoia, in relazione alla sua capacità di abbassare il pH, tale parametro è stato misurato nei prodotti commerciali (Omori & Nakano, 2001). Nelle tabelle 8.1a e 8.1b sono riportati i valori di pH misurati sulle salamoie e sui tessuti prelevati dai campioni commerciali ed i valori di alluminio misurati su 10 campioni di tessuto (5 PC e 5 RE) prelevati dai campioni commerciali. Come prevedibile, il valore del pH è risultato più basso nei prodotti PC (3.84 ± 0.28) rispetto agli RE (5.9 ± 0.82) che vengono desalati prima di essere commercializzati.

L'Allume di Potassio $KAl(SO_4)_2$, ingrediente essenziale nella realizzazione dei prodotti a base di medusa, si accumula nei tessuti in concentrazioni elevate: Wong *et al.*, (2010), ne hanno rilevato una quantità media di 1200 mg/kg nei prodotti RE reperiti sul mercato giapponese. Nel presente studio abbiamo commissionato un'analisi di 10 campioni al fine di determinare il contenuto totale di Alluminio; l'analisi è stata effettuata attraverso spettroscopia ad assorbimento atomico ed ha rivelato valori compresi tra 484 mg/kg e 1450 mg/kg. Questa diversità nelle concentrazioni può essere spiegata in considerazione del fatto che, nella preparazione del prodotto, i tempi di esposizione, le temperature e la quantità di allume utilizzata incidono sulla ritenzione di alluminio nei tessuti (Hsieh *et al.*, 2001).

Codice	Provenienza	Etichettatura		pH		Analisi Alluminio mg/kg
		Den. commerciale	Den. Scientifica	S	T	
PC-1	Prato / M	Medusa	R. esculentum	3.78	3.75	
PC-2	Prato / M	Medusa	R. esculentum	3.43	3.93	694
PC-3	Prato / M	Medusa	R. esculentum	3.42	3.88	
PC-4	Prato / M	Medusa	R. esculentum	3.82	3.95	951
PC-5	Prato / M	Medusa	R. esculentum	3.41	4.01	
PC-6	Prato / M	Medusa	R. esculentum	3.54	3.95	
PC-7	Prato / M	Medusa	R. esculentum	3.57	4.08	484
PC-8	Prato / M	Medusa	R. esculentum	3.77	4.05	
PC-9	Prato / M	Medusa	R. esculentum	3.63	3.84	
PC-10	Firenze/M	Medusa	R. esculentum	3.62	4.21	1450
PC-11	Roma / M	Medusa	---	3.36	3.76	1190
PC-12	Roma / M	---	---	3.76	4.01	
PC-13	Roma / M	Medusa	R. esculentum	3.21	3.37	
PC-14	Roma / M	Medusa	R. esculentum	3.09	3.19	
PC-15	Roma / M	Medusa	R. esculentum	3.76	4.19	
PC-16	Roma / M	Medusa	R. esculentum	3.68	3.81	
PC-17	Roma / M	Medusa	R. esculentum	3.19	3.34	
PC-18	Firenze/M	---	---	3.42	3.62	
PC-19	Prato / M	Medusa	R. esculentum	3.51	3.79	
PC-20	Prato / M	Medusa Asiatica	R. esculentum	3.52	3.55	
PC-21	Prato / M	Medusa Asiatica	R. esculentum	3.69	3.92	
PC-22	Prato / M	Medusa Asiatica	R. esculentum	3.72	3.86	
PC-23	Zhejiang / M	Medusa	---	3.65	3.78	
PC-24	Zhejiang / M	Medusa	---	3.20	3.40	
PC-25	Zhejiang / M	Medusa	---	3.42	3.65	
PC-26	Zhejiang / M	Medusa	---	3.61	3.89	
PC-27	Zhejiang / M	Medusa	---	3.62	3.75	
PC-28	Zhejiang / M	Medusa	---	3.19	3.48	
PC-29	Jangsu / M	Medusa	---	3.45	3.62	
PC-30	Jangsu / M	Medusa	---	3.50	3.75	

Tab. 7.1a: Prodotti classici in salamoia (PC) analizzati in questo studio e relativi valori di pH e di alluminio(campioni evidenziati in azzurro)

Codice	Provenienza	Etichettatura		pH	Analisi Alluminio mg/kg
		Commercial name	Scientific name		
RE-1	Prato / M	Bamboo	---	3.25	859
RE-2	Prato / M	Bamboo	---	5.86	725
RE-3	Prato / M	Medusa	R. esculentum	5.88	
RE-4	Prato / M	Medusa	R. esculentum	6.14	435
RE-5	Milano / M	Medusa	R. esculentum	5.79	
RE-6	Milano / M	Medusa	R. esculentum	5.27	617
RE-7	Milano / M	Medusa	R. esculentum	6.23	528
RE-8	Prato / M	Tubero di senape	---	4.34	
RE-9	Prato / M	Tubero di senape	---	4.83	
RE-10	Firenze / M	Tubero di senape	---	5.22	
RE-11	Roma / M	Tubero di senape	---	5.47	
RE-12	Roma / M	Medusa	R. esculentum	5.66	
RE-13	Roma / M	Medusa	R. esculentum	6.01	
RE-14	Roma / R	Medusa	---	7.12	
RE-15	Roma / M	Medusa	R. esculentum	4.79	
RE-16	Roma / M	Medusa	R. esculentum	4.78	
RE-17	Roma / M	Tubero di senape	---	4.66	
RE-18	Roma / M	Tubero di senape	---	6.34	
RE-19	Roma / M	Medusa	R. esculentum	6.45	
RE-20	Firenze / M	Medusa	R. esculentum	7.47	
RE-21	Firenze / M	Medusa	R. esculentum	7.36	
RE-22	Firenze / M	Medusa	R. esculentum	6.94	
RE-23	Firenze / M	Medusa	R. esculentum	6.19	
RE-24	Firenze / R	Medusa	---	7.08	
RE-25	Prato / M	Medusa	R. esculentum	3.27	
RE-26	Prato / M	Medusa	R. esculentum	7.47	
RE-27	Milano / M	Medusa	R. esculentum	5.74	
RE-28	Milano / M	---	---	5.59	
RE-29	Milano / M	---	---	5.26	
RE-30	Milano / M	---	---	4.95	
RE-31	Milano / M	---	---	6.18	
RE-32	Prato / M	Medusa	R. esculentum	5.45	
RE-33	Prato / M	Medusa	R. esculentum	6.70	
RE-34	Prato / M	Medusa	R. esculentum	6.16	
RE-35	Prato / M	Medusa	R. esculentum	4.89	
RE-36	Prato / M	---	---	5.03	
RE-37	Prato / M	Tubero di senape	---	5.54	
RE-38	Prato / M	Giglio d'oro	Hemerocallis fulva	5.06	
RE-39	Prato / M	Giglio d'oro	Hemerocallis fulva	4.97	
RE-40	Prato / M	Giglio d'oro	Hemerocallis fulva	4.86	
RE-41	Prato / M	Medusa	R. esculentum	5.98	
RE-42	Prato / M	Medusa	R. esculentum	5.81	
RE-43	Prato / R	Medusa	---	7.09	
RE-44	Prato / R	Medusa	---	6.90	
RE-45	Firenze/M	Medusa	R. esculentum	4.56	
RE-46	Firenze/M	Medusa	R. esculentum	5.12	
RE-47	Firenze/M	Tubero di senape	---	4.89	
RE-48	Firenze/M	Tubero di senape	---	4.47	

Tab. 7.1b: Prodotti Ready to eat (RE) analizzati in questo studio e relativi valori di pH e di alluminio(campioni evidenziati in azzurro).

7.2 ESTRAZIONE DNA TOTALE: CONCENTRAZIONE E QUALITÀ DEL DNA ESTRATTO

L'amplificabilità del DNA dipende non soltanto dalla sua qualità (intesa come assenza di sostanze inibitrici), ma anche dall'integrità delle sequenze target, che potrebbero subire una degradazione durante i vari step di lavorazione del prodotto. Infatti, mentre il DNA estratto da campioni freschi presenta generalmente lunghi frammenti (>1 kb) (Teletchea, 2009), quello ottenuto dai prodotti commerciali si presenta molto spesso altamente degradato (Armani *et al.*, 2012a). Uno dei principali fattori responsabili di tale fenomeno è senz'altro il pH acido (Teletchea, 2009), che determina la frammentazione dei filamenti di DNA, con effetti che risultano addirittura peggiori di quelli provocati dalla bollitura (Armani *et al.* 2012a).

7.2.1. Valutazione spettrofotometrica e resa

Le letture spettrofotometriche effettuate sul DNA estratto dai tessuti provenienti da campioni identificati morfologicamente hanno evidenziato una buona qualità dell'estratto. In particolare, non sono stati rilevati picchi con assorbanza a A280 né a A230, imputabili rispettivamente alla presenza di proteine o polipeptidi o residui organici e acidi nucleici liberi e, i rispettivi rapporti (260/280 e 260/230), sono sempre stati compresi fra 1.70 e 2.10. Le rese sono state variabili con valori compresi fra 0,16 e 0,35 µg/ml. La qualità spettrofotometrica e le rese dei campioni commerciali, sia PC che RE, sono risultate paragonabili a quelle dei campioni morfologicamente identificati.

7.2.2 Valutazione dell'integrità del DNA mediante elettroforesi su gel d'Agarosio

La corsa elettroforetica del DNA totale effettuata su gel di agarosio, ha messo in luce, nel DNA estratto dai campioni commerciali, un elevato livello di degradazione. In particolare, il DNA totale estratto dai prodotti PC risultava composto da frammenti che, nella maggior parte dei casi erano compresi fra le 50 e le 250 bp mentre, solo in pochi campioni, raggiungevano le 500-600 bp (*Fig.7.1*). Al contrario, il DNA totale ottenuto dai prodotti RE si presentava costituito da frammenti piuttosto lunghi (fino a 1 kb), seppure, in alcuni casi, il grado di degradazione risultasse paragonabile a quello dei prodotti PC. Precedenti studi hanno messo in evidenza che l'acidità del prodotto contribuisce alla degradazione del DNA in maniera strettamente associata al tempo di esposizione ed alla temperatura (Bauer *et al.*, 2003; Armani *et al.*, 2012a). Inoltre, la lunga *shelf life* dei prodotti a base di medusa

(12 mesi negli RE e 24 mesi nei PC) ed il fatto che essi siano stati acquistati presso esercizi di vendita che li espongono su scaffali a temperatura ambiente (sebbene le indicazioni relative alla modalità d'uso ne suggeriscano la refrigerazione) (Hsieh *et al.*, 2001; Armani *et al.*, 2012c) potrebbero spiegare la variabilità dei gradi di frammentazione del DNA osservati.

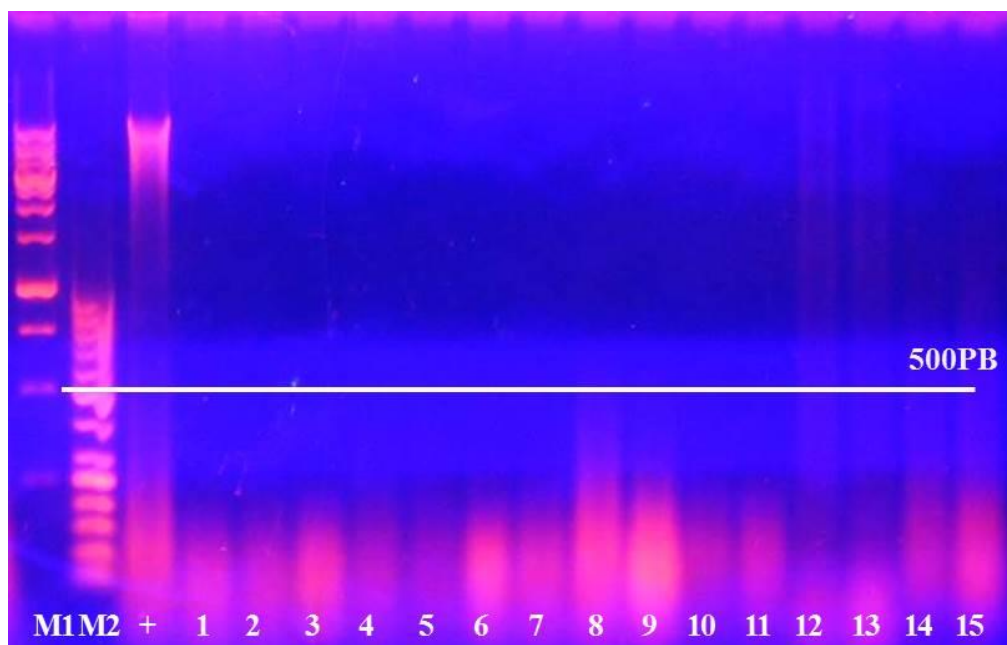


Fig 7.1 corsa del DNA totale ottenuto da alcuni campioni commerciali : M1- SHARPMASS1kb; M2 - SHARPMASS50BP 1.PC-2; 2.PC-3; 3.PC-6; 4.PC-11; 5.PC-12; 6.PC-15; 7.PC-27; 8.PC-17; 9.PC-13; 10.RE-23; 11.RE-28; 12.RE-2; 13.RE-21; 14.RE-34; 15.RE-15.

7.3 ANALISI DELLE SEQUENZE E VALUTAZIONE DELL'EFFICIENZA DEI PRIMER PER L'AMPLIFICAZIONE DEL FRAMMENTO DI FOLMER SUL GENE MITOCONDRIALE *COI*.

La maggior parte degli studi indirizzati all'identificazione di specie attraverso l'analisi molecolare del gene mitocondriale *COI* ha utilizzato i primers disegnati da Folmer *et al.* (1994) per amplificare le prime 700bp. Questi primers hanno dato buoni risultati per quanto riguarda la specie *Rhizostoma pulmo* (Ramsak *et al.*, 2012), mentre, in altre specie, quali ad esempio il *Catostylus mosaicus* (Dawson, 2005), è stato necessario apportare alcune modifiche alle sequenze nucleotidiche di tali primers. Al fine di disegnare primers in grado di amplificare il frammento *COI* di Folmer a partire dal DNA della maggior parte delle specie di medusa commestibili appartenenti all'Ordine delle Rhizostomeae e delle Semaestomeae, abbiamo recuperato dai Databases tutte le sequenze d'interesse e le abbiamo analizzate. Su GenBank erano disponibili soltanto le sequenze complete per nove

specie (5 Rhizostomeae e 4 Semaestomeae), mentre su BOLD non ne abbiamo trovata nessuna. Questo potrebbe essere spiegato in relazione al fatto che l'obiettivo principale del BOLD è quello di creare un sistema di DNA barcoding basato esclusivamente sulla prima parte del gene COI. Conseguentemente, le sequenze depositate hanno una lunghezza di 650 bp, o addirittura meno, e tale incompletezza potrebbe rappresentare un limite, soprattutto quando si deve ricorrere a modificazioni dei primers per migliorare l'efficienza dell'amplificazione.

I primers per l'amplificazione del frammento di Folmer, sono stati testati, a mezzo PCR, sul DNA estratto dai campioni di riferimento per valutare le loro performance di amplificazione. Il miglior risultato in termini di amplificazione (intensità della banda valutata attraverso la visualizzazione con raggi UV), specificità (nessun prodotto di amplificazione aspecifico), assenza di interazione fra primers (nessuna amplificazione nel bianco) e percentuale di successo di amplificazione dei prodotti freschi, è stato ottenuto utilizzando i primer FFDL e FRDL2. (Fig 7.2).

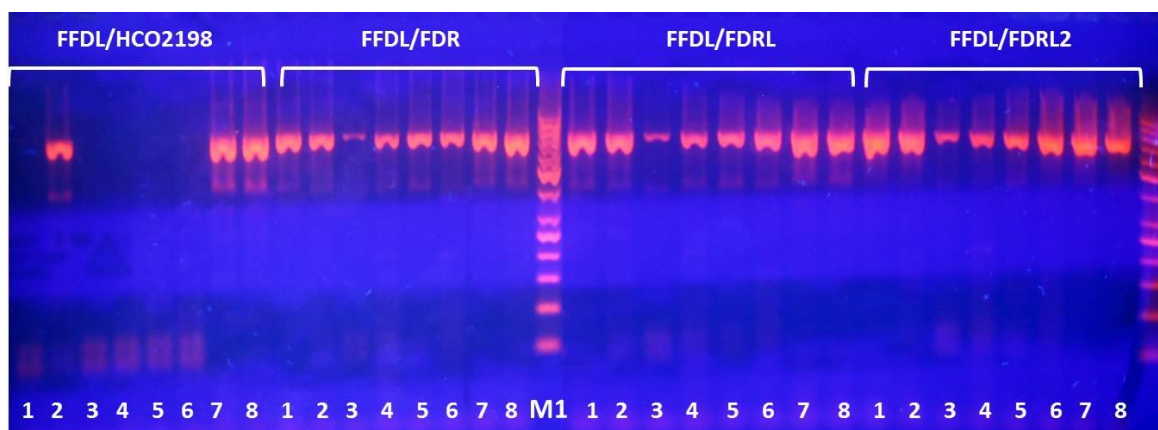


Fig 7.2: performance di amplificazione dei primer degenerati per l'amplificazione del frammento del gene COI mitocondriale individuato dai primer Folmer.

L'utilizzo di primers degenerati, peraltro mai riportato in letteratura, si è rivelato un buon espediente per incrementare le performance di amplificazione. Inoltre, la possibilità di utilizzare la stessa coppia di primers per amplificare contemporaneamente lo stesso frammento genico, partendo da DNA provenienti da diversi campioni, ha permesso di semplificare le procedure di analisi. Infine, grazie anche all'utilizzo delle code oligonucleotidiche di Steffens *et al.* (1993) sono state ottenute 54 sequenze relative al gene COI di 658pb relative ai campioni identificati morfologicamente (Tab. 7.2). Questa è la prima volta che sono state ottenute le sequenze COI di *Cotylorhiza tuberculata*, *Lychnorhiza lucerna* e *Cyanea lamarkii*.

Order	Famiglia	Specie	Istituto di ricerca	Codice di deposito GenBank	BLAST (identità)		
					BOLD	GenBank	
Rhizostomeae	Catostylidae	<i>Catostylus mosaicus</i>	Australian Museum Sydney Australia	HF548537	100% <i>C. mosaicus</i>		
				HF548538			
			Australian Rivers Institute Griffith School of Environment Gold Coast Campus	HF548539			
				HF968746			
	Cassiopeidae	<i>Cassiopea spp.</i>	Department of Chemistry, Biology and Marine Science, Faculty of Science, University of the Ryukyus, Okinawa, Japan	HF930519	100% <i>C. frondosa</i>		
			Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover ITZ, Ecology and Evolution Germany	HF930520			
		<i>Cassiopea andromeda</i>	National Center for Mariculture Israel Oceanographic and Limnological Research Eilat, Israel	HF930521	100% <i>C. andromeda</i>		
	Cepheidae	<i>Cotylorhiza tuberculata</i>	Instituto de Ciencias Marinas de Andalucia, ICMAN (CSIC) Puerto Real, Cadiz	HF930531	NS		
				HF930532			
			Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover ITZ, Ecology and Evolution Germany	HF930533			
				HF930534			
	Lychnorhizidae	<i>Lychnorhiza lucerna</i>	Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Brasil	HF930535	NS		
				HF930522			
				LLUC2			
				LLUC3			
	Rhizostomatidae	<i>Rhizostoma pulmo</i>	Dipartimento Scienze Veterinarie Università di Pisa	LLUC4	NS	99% <i>R. pulmo</i>	
				LLUC5			
				HF536559			
				HF536560			
			Instituto de Ciencias Marinas de Andalucia, ICMAN (CSIC) Puerto Real, Cadiz	HF536561			
				HF536562			
				HF545304			
				HF545305			
		<i>Nemopilema nomurai</i>	Japan Sea National Fisheries Research Institute, Fisheries Research Agency, Niigata, Japan	HF545306	99-100% <i>N. nomurai</i>		
				HF545307			
				HF545308			
				HF930513			
				HF536563			
				HF536564			
				HF536565			
				HF536566			
		<i>Rhopilema esculentum</i>	Ocean University of China, Fisheries of College, Qingdao, China	HF536567	NS	99-100% <i>R. esculentum</i>	
				HF536568			
				HF536569			
				HF536570			
	<i>Rhopilema nomadica</i>	Israel Oceanographic and Limnological Research National Center for Mariculture Eilat, Israel	HF536571	NS	99% <i>R. nomadica</i>		
			HF536572				
			HF536573				
			HF536574				
Cyaneidae	<i>Cyanea lamarckii</i>	Institute of Coastal Research Marine Bioanalytical Chemistry Germany	HF930514	100% <i>C. lamarckii</i>	NS		
	<i>Cyanea capillata</i>		HF930515				
Semaestomeae	Pelagidae	<i>Pelagia noctiluca</i>	Dipartimento di Biologia, Università di Genova, Genova	HF930516	NS	99% <i>R. nomadica</i>	
				Department of Marine Biology, University of Haifa, Israel			HF930517
			Dipartimento Scienze Veterinarie Università di Pisa	HF930518			
				HF930519			
	Ulmariidae	<i>Aurelia aurita</i>	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover ITZ, Ecology and Evolution Buenteweg, Hannover Germany	HF930520	99-100% <i>C. capillata</i>		
				HF930521			
	Pelagidae	<i>Pelagia noctiluca</i>	Dipartimento di Biologia, Università di Genova, Genova	HF930522	NS	100% <i>P. noctiluca</i>	
				HF930523			
				Dipartimento Scienze Veterinarie Università di Pisa			HF930524
							HF930525
Ulmariidae	<i>Aurelia aurita</i>	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover ITZ, Ecology and Evolution Buenteweg, Hannover Germany	HF930526	99-100% <i>C. capillata</i>			
			HF930527				
Pelagidae	<i>Pelagia noctiluca</i>	Dipartimento di Biologia, Università di Genova, Genova	HF930528	NS	100% <i>P. noctiluca</i>		
			HF930529				
Ulmariidae	<i>Aurelia aurita</i>	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover ITZ, Ecology and Evolution Buenteweg, Hannover Germany	HF930530	99-100% <i>C. capillata</i>			
			HF930531				

Tab. 7.2: Codici di accesso GenBank e risultati dell'analisi BLAST delle sequenze ottenute dai campioni identificati. (tratto da: Armani *et al.* 2013 doi:10.1016/j.foodres.2013.10.003)

7.3.1 Utilizzo della Siero Albumina Bovina (BSA) per migliorare la performance di amplificazione

Le prove effettuate con concentrazioni scalari di BSA hanno evidenziato che la concentrazione ottimale per ottenere un miglioramento delle performance di amplificazione è stata 25 ng/μL (*Fig. 7.3*).

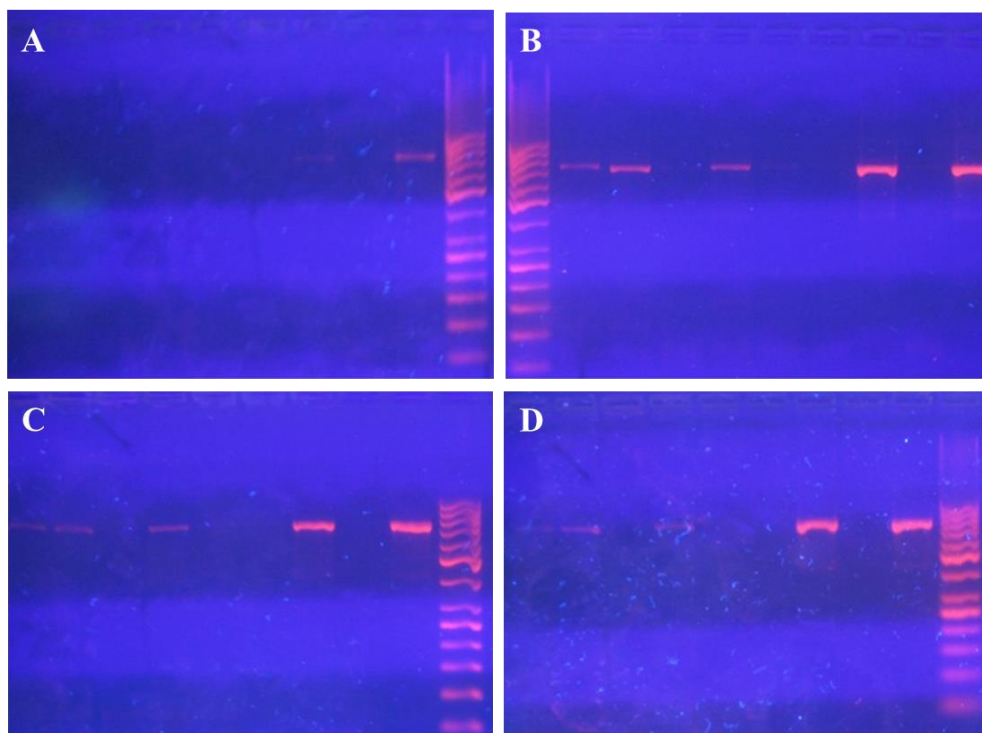


Fig. 7.3: Corsa elettroforetica (Gel di agarosio al 2%) di prodotti di PCR relative alle prove di amplificazione in presenza di concentrazioni crescenti di BSA. **A= 0** ng/μL; **B= 25** ng/μL; **C= 50** ng/μL; **D= 100** ng/μL.

7.4 PROGETTAZIONE DEI PRIMER REVERSE INTERNI PER L'AMPLIFICAZIONE DI FRAMMENTI INTERNI ALLA SEQUENZA FOLMER

Considerando il livello di degradazione del DNA osservato attraverso l'analisi elettroforetica, abbiamo disegnato nuovi primers reverse interni per amplificare alcuni frammenti più corti del gene *COI* in associazione al primer forward FFDL e, successivamente, ne abbiamo testato la capacità di amplificazione. Dai test effettuati sulle specie morfologicamente identificate i primers REV514A, REV256A, REV193HS, REV163, REV133 (per le sequenze dei primer vedere *Tab. 6.3*) hanno mostrato le migliori performance in termini di specificità e intensità di amplificazione e sono stati selezionati per l'analisi molecolare dei prodotti commerciali (*Fig. 7.4*).

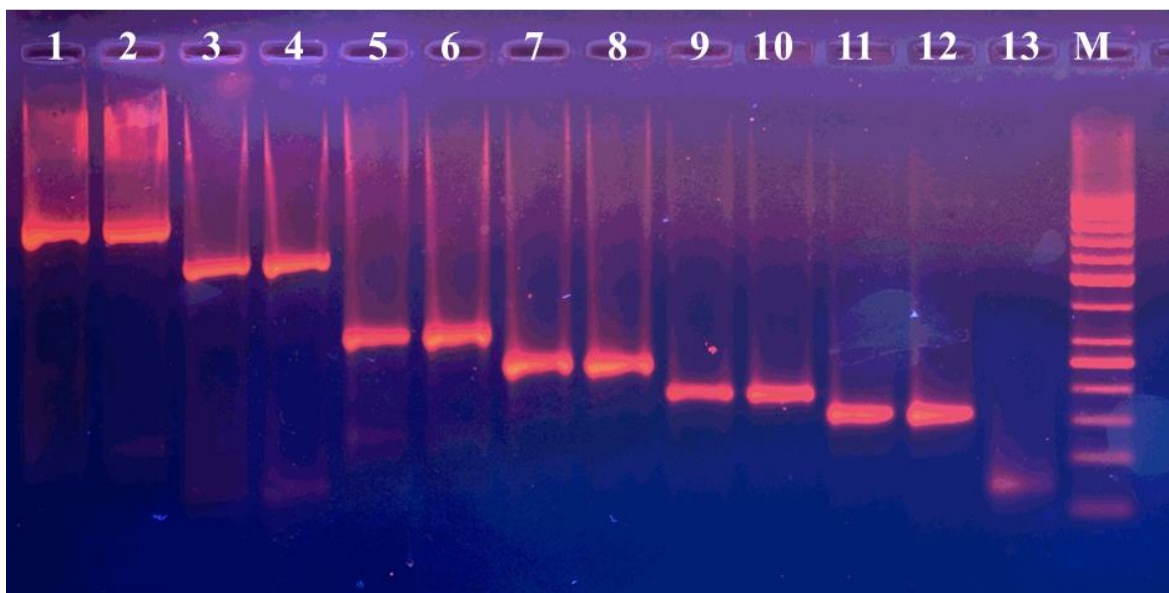


Fig. 7.4: Corsa elettroforetica (Gel di agarosio al 2%) di prodotti di PCR ottenuti dall'amplificazione del DNA di due specie di riferimento (*R. esculentum* e *N. nomurai*) con i primers reverse ed il forward FFDL disegnati in questo studio. 1-2: FRDL2; 3-4: REV514A; 5-6: REV256A; 7-8: REV193HS; 9-10: REV163; 11-12: REV133; 13: controllo negativo; M: SharpMass50.

Quelli selezionati sono stati utilizzati per amplificare il DNA dei campioni provenienti dai prodotti commerciali, per la maggior parte dei quali tuttavia l'amplificazione non è riuscita, o comunque sono state ottenute bande troppo flebili per poter essere sequenziate. In particolare, abbiamo constatato che gli effetti degli inibitori recano danni maggiori ai frammenti lunghi piuttosto che a quelli corti. Infatti, anche se alcuni campioni testati presentavano frammenti di DNA che superava le 700 bp, non è stato possibile ottenere ampliconi di lunghezza superiore alle 265 bp.

7.5 LA VALUTAZIONE DEGLI INIBITORI DELLA PCR NEL DNA DEI CAMPIONI PC

L'estrazione di DNA contaminato da sostanze inibitrici è senza dubbio uno dei maggiori ostacoli all'utilizzo delle metodiche di PCR in campo alimentare. Gli inibitori possono infatti interferire con la reazione, provocando una riduzione o addirittura un annullamento dell'efficienza di amplificazione (Teletchea, 2009). Sebbene i meccanismi di inibizione di molte di queste sostanze siano stati studiati e, laddove possibile, si possano prevenire, per altre invece ancora oggi essi rimangono del tutto sconosciuti. Alla luce della scarsissima percentuale di successo nell'amplificazione del DNA proveniente dai prodotti commerciali estratti secondo il protocollo standard, abbiamo ritenuto opportuno approfondire il problema, effettuando ricerche ed indagini al riguardo. Un semplice espediente è stato il

ricorso alle diluizioni seriali, che ha permesso di amplificare il DNA dei campioni contaminati. Infatti, la sensibilità della PCR consente di amplificare il DNA bersaglio ancora presente nel campione una volta che gli inibitori sono stati diluiti; in genere, una diluizione di 100 volte quella del *template* di partenza è in genere sufficiente a ridurre gli effetti degli inibitori. Tuttavia, le diluizioni non sono state risolutive. Pertanto, abbiamo proceduto aggiungendo al DNA di *N. nomurai* (controllo positivo) una soluzione (a concentrazione crescente) di DNA ottenuto da campioni di prodotti commerciali che non eravamo riusciti ad amplificare col metodo delle diluizioni seriali. L'amplificazione è riuscita ed ha dunque dimostrato l'assenza di inibitori liberi nella soluzione di DNA. Tale ipotesi è stata confermata dal fatto che l'amplificazione è stata fallimentare anche in seguito all'utilizzo del kit di purificazione Agencourt®AMPure®XP PCR (Beckman Coulter, Beverly, Massachusetts, USA). Ciò suggerisce che l'inibizione della PCR è in qualche modo direttamente associata alle molecole del DNA.

A questo proposito ricordiamo che l'alluminio, poiché in grado di complessarsi con le molecole di DNA (Wu *et al.*, 2005), è capace di inibire le reazioni di PCR (Wadowshy *et al.*, 1994) e questo potrebbe aver contribuito al fallimento del processo di amplificazione dei campioni di DNA provenienti dai prodotti commerciali.

7.6 OTTIMIZZAZIONE DEL PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE ED AMPLIFICAZIONE DEI CAMPIONI COMMERCIALI

La scelta di un metodo di estrazione valido è di importanza determinante per la riuscita della PCR. Sebbene vengano continuamente proposte svariate tecniche di estrazione, basate su kit commerciali o procedure classiche, è abbastanza improbabile che un unico metodo possa risultare valido per ogni tipo di campione. Considerando che soltanto 2 ore di pre-lavaggio sotto acqua corrente prima di procedere all'estrazione classica non sono state sufficienti ad ottenere un DNA di buona qualità (in termini di assenza di contaminanti), abbiamo testato delle procedure alternative: oltre a lavare (dissalare) i campioni con acqua corrente, li abbiamo incubati in EDTA, sostanza nota per le sue proprietà chelanti, allo scopo di ridurre la concentrazione di alluminio nella soluzione di DNA finale. Il risultato migliore, in termini di resa e qualità del DNA (nessun tipo di inibizione durante la fase di amplificazione) sia nei campioni RE che in quelli PC, è stato ottenuto attraverso un pre-lavaggio sotto acqua corrente della durata di 24-48 ore. Tempi superiori (72 ore) non hanno mostrato miglioramenti incisivi sulla fase di amplificazione ma, anzi, hanno ridotto drasticamente la quantità di DNA recuperata in seguito

all'estrazione. L'incubazione a temperatura ambiente in una soluzione di EDTA 400mM per un'ora ha incrementato la performance amplificativa, specialmente nei frammenti di 709 bp (*Fig. 7.5*). Alla luce di questi risultati abbiamo scelto di utilizzare un pre-trattamento standard per tutti i prodotti, ossia quello basato sul lavaggio sotto acqua corrente per 48 ore seguito da incubazione dell'aliquota di tessuto in soluzione di EDTA 400 mM per un'ora a temperatura ambiente. Con il suddetto metodo è stato possibile amplificare il DNA estratto da tutti i prodotti commerciali e sequenziarlo.

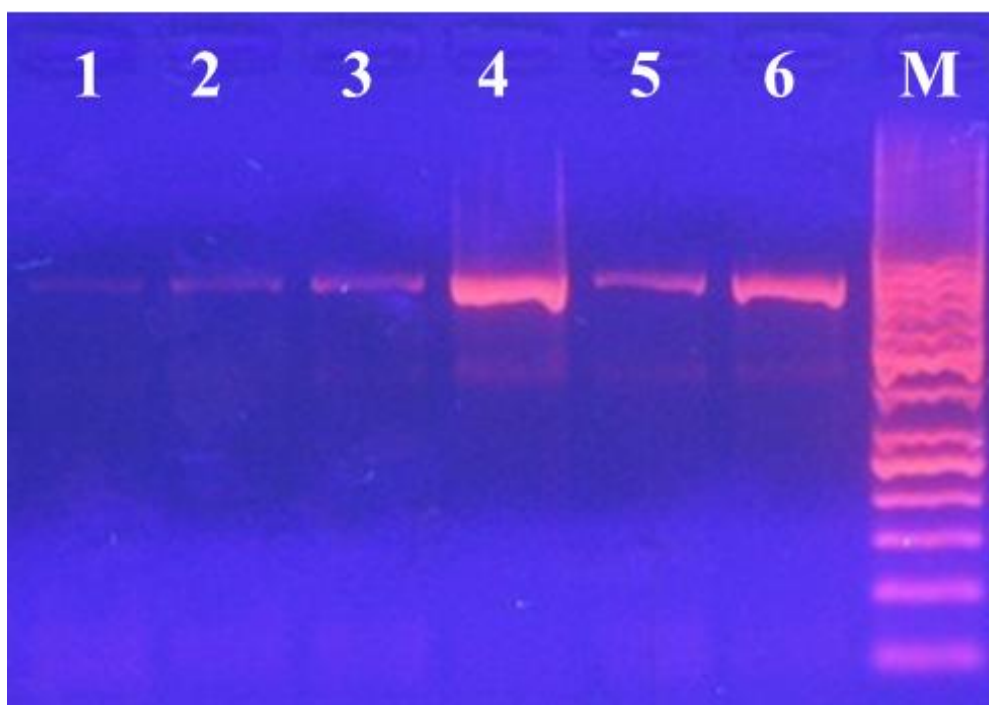


Fig 7.5: Effetti dei pretrattamento sull'amplificazione del frammento di Folmer (709pb) su DNA estratto da PC. 1: 2h di prelavaggio; 2: 2h di prelavaggio + EDTA; 3: 24h di prelavaggio; 4: 24h di prelavaggio + EDTA; 5: 48h di prelavaggio; 6: 48h di prelavaggio + EDTA. Corsa elettroforetica effettuata su gel di agarosio al 2%. (tratto da: Armani *et al.* 2013 doi:10.1016/j.foodres.2013.10.003)

In particolare, per i prodotti RE abbiamo ottenuto: 20 sequenze (42%) di 658 bp, 16 (33%) di 206 bp e 12 (25%) di 145 bp. Nel caso dei PC: 6 sequenze (17,5%) di 658 bp, 9 (26,5%) di 206 bp e 19 (56%) di 145 bp. Questi risultati hanno dimostrato l'influenza negativa della degradazione del DNA in sinergia con l'inibizione da contaminanti sulla reazione di amplificazione (*Tab. 7.3a e b*).

Cod	Etichettatura		Ln framm-acc. N.	Identità	
	Commercial name	Scientific name		BOLD	GenBank
PC-1	Medusa	R. esculentum	145 - HF937325	NM	100% R.esculentum
PC-2	Medusa	R. esculentum	145 - HF937326	NM	100%R.pulmo
PC-3	Medusa	R. esculentum	145 - HF937327	99% N.nomurai	
PC-4	Medusa	R. esculentum	145 - HF937328	99% N.nomurai	
PC-5	Medusa	R. esculentum	145 - HF937329	NM	100% R.esculentum
PC-6	Medusa	R. esculentum	145 - HF937330	100% N.nomurai	
PC-7	Medusa	R. esculentum	658 - HF937284	99% N.nomurai	
PC-8	Medusa	R. esculentum	658 - HF937285	100% N.nomurai	
PC-9	Medusa	R. esculentum	206 - HF937304	NM	100% R.esculentum
PC-10	Medusa	R. esculentum	206 - HF937305	100% N.nomurai	
PC-11	Medusa	---	206 - HF937306	NM	100% R.esculentum
PC-12	---	---	206 - HF937307	100% N.nomurai	
PC-13	Medusa	R. esculentum	658 - HF937286	NM	99%R.pulmo
PC-14	Medusa	R. esculentum	145 - HF937331	NM	100%P.noctiluca
PC-15	Medusa	R. esculentum	206 - HF937308	100% N.nomurai	
PC-16	Medusa	R. esculentum	145 - HF937332	NM	100%P.noctiluca
PC-17	Medusa	R. esculentum	145 - HF937333	NM	100% R.esculentum
PC-18	---	---	206 - HF937309	99% N.nomurai	
PC-19	Medusa	R. esculentum	145 - HF937334	100% N.nomurai	
PC-20	Medusa Asiatica	R. esculentum	145 - HF937335	NM	85%C.stuhlmanni
PC-21	Medusa Asiatica	R. esculentum	206 - HF937310	NM	86%R.nomadica
PC-22	Medusa Asiatica	R. esculentum	145 - HF937336	NM	85%C.stuhlmanni
PC-23	Medusa	---	145 - HF937337	NM	100%P.noctiluca
PC-24	Medusa	---	658 - HF937287	NM	100% R.esculentum
PC-25	Medusa	---	145 - HF937338	NM	100%P.noctiluca
PC-26	Medusa	---	145 - HF937339	NM	100%P.noctiluca
PC-27	Medusa	---	206 - HF937311	NM	100%P.noctiluca
PC-28	Medusa	---	206 - HF937312	NM	100%P.noctiluca
PC-29	Medusa	---	145 - XX	NM	100% R.esculentum
PC-30	Medusa	---	658 - XX	99% N.nomurai	

Tab. 7.3a: Sequenze ottenute dai campioni commerciali PC e risultati dell'analisi BLAST. (tratto da: Armani et al.2013 doi:10.1016/j.foodres.2013.10.003)

Codice	Etichettatura		Lungh. framm – Accession n.	Identità	
	Commercial name	Scientific name		Bold	GenBank
RE-1	Bamboo	---	145- HF937313	100% N. nomurai	
RE-2	Bamboo	---	658 -HF930536	100% N. nomurai	
RE-3	Medusa	R. esculentum	658 - HF930537	100% N. nomurai	
RE-4	Medusa	R. esculentum	206 - HF937288	100% N. nomurai	
RE-5	Medusa	R. esculentum	658 - HF930538	100% N. nomurai	
RE-6	Medusa	R. esculentum	658 - HF930539	99% N. nomurai	
RE-7	Medusa	R. esculentum	145- HF937314	100% N. nomurai	
RE-8	Tubero di senape	---	658 - HF930540	100% N. nomurai	
RE-9	Tubero di senape	---	658 - HF930541	99% N. nomurai	
RE-10	Tubero di senape	---	658 - HF930542	99% N. nomurai	
RE-11	Tubero di senape	---	658 - HF930543	100% N. nomurai	
RE-12	Medusa	R. esculentum	658 - HF930544	100% N. nomurai	
RE-13	Medusa	R. esculentum	658 - HF930545	100% N. nomurai	
RE-14	Medusa	---	658 - HF930546	NM	100% R.esculentum
RE-15	Medusa	R. esculentum	658 - HF930547	100% N. nomurai	
RE-16	Medusa	R. esculentum	206 - HF937289	100% N. nomurai	
RE-17	Tubero di senape	---	145 -HF937315	100% N. nomurai	
RE-18	Tubero di senape	---	145 - HF937316	100% N. nomurai	
RE-19	Medusa	R. esculentum	658 - HF930548	99% N. nomurai	
RE-20	Medusa	R. esculentum	206 - HF937290	100% N. nomurai	
RE-21	Medusa	R. esculentum	658 - HF930549	100% N. nomurai	
RE-22	Medusa	R. esculentum	206 - HF937291	100% N. nomurai	
RE-23	Medusa	R. esculentum	206 - HF937292	100% N. nomurai	
RE-24	Medusa	---	658- HF930550	NM	100%R.esculentum
RE-25	Medusa	R. esculentum	145 - HF937317	100% N. nomurai	
RE-26	Medusa	R. esculentum	206 - HF937293	100% N. nomurai	
RE-27	Medusa	R. esculentum	658 - HF930551	99% N. nomurai	
RE-28	---	---	206 - HF937294	100% N. nomurai	
RE-29	---	---	206 - HF937295	100% N. nomurai	
RE-30	---	---	145 - HF937318	100% N. nomurai	
RE-31	---	---	145 - HF937319	100% N. nomurai	
RE-32	Medusa	R. esculentum	145- HF937320	100% N. nomurai	
RE-33	Medusa	R. esculentum	145 - HF937321	100% N. nomurai	
RE-34	Medusa	R. esculentum	206 - HF937296	100% N. nomurai	
RE-35	Medusa	R. esculentum	145 - HF937322	100% N. nomurai	
RE-36	---	---	145 - HF937323	100% N. nomurai	
RE-37	Tubero di senape	---	145 - HF937324	100% N. nomurai	
RE-38	Giglio d'oro	Hemerocallis fulva	206 - HF937297	100% N. nomurai	
RE-39	Giglio d'oro	Hemerocallis fulva	206 - HF937298	100% N. nomurai	
RE-40	Giglio d'oro	Hemerocallis fulva	658 - HF937280	99% N. nomurai	
RE-41	Medusa	R. esculentum	206 - HF937299	100% N. nomurai	
RE-42	Medusa	R. esculentum	206 - HF937300	100% N. nomurai	
RE-43	Medusa	---	658 - HF937281	99% N. nomurai	
RE-44	Medusa	---	658 - HF937282	NM	100% R.esculentum
RE-45	Medusa	R. esculentum	206 - HF937301	100% N. nomurai	
RE-46	Medusa	R. esculentum	206 - HF937302	100% N. nomurai	
RE-47	Tubero di senape	---	206 - HF937303	99% N. nomurai	
RE-48	Tubero di senape	---	658 - HF937283	100% N. nomurai	

Tab. 7.3b: Sequenze ottenute dai campioni commerciali RE e risultati dell'analisi BLAST. (tratto da: Armani et al.2013 doi:10.1016/j.foodres.2013.10.003)

7.7 ANALISI FILOGENETICA

La possibilità di identificare i prodotti della pesca è una priorità assoluta dei controlli ufficiali e l'analisi FINS di alcuni frammenti dei geni mitocondriali è uno dei metodi più utilizzati a questo scopo (Armani *et al.*, 2011a; Pepe *et al.*, 2007). Nonostante la maggior parte degli studi abbiano utilizzato sequenze di lunghezza superiore alle 350 bp, Hajibabei, *et al.*, (2006) hanno dimostrato che un breve frammento del gene *COI* (100 bp) può essere utilizzato con successo per identificare moltissime specie animali. Nel presente studio, considerando il fatto che la maggior parte dei campioni provenienti da prodotti commerciali presentava un DNA altamente degradato, abbiamo utilizzato un frammento di 145 bp. Tuttavia, poiché molte sequenze depositate mancavano di alcune basi in posizione 5', abbiamo infine optato per un frammento di 142 bp, utilizzando 192 sequenze, per la costruzione di un albero NJ con 2000 replicati (Fig. 7.6). Anche se le relazioni filogenetiche tra le famiglie, ottenute dalla nostra analisi, non sono state del tutto risolutive, fatta eccezione per le famiglie *Cepheidae*, *Mastigida* e *Cassiopeidae*, il nostro albero concorda con quello realizzato da Bayha, Dawson, Collins, Barbeitos & Haddock (2010) con l'utilizzo di due geni nucleari. In particolare, le specie appartenenti all'ordine delle *Semaestomeae* hanno formato diversi clusters corrispondenti alle famiglie *Pelagidae*, *Ulmaridae*, *Cyaneida* e *Drymonematidae*. Le specie appartenenti all'ordine delle *Rhizostomeae* sono state raggruppate in base al sottordine, fatta eccezione per la specie *Lychnorhiza lucerna*. Infatti, tutte le specie appartenenti all'Ordine delle *Kolpophore* (Famiglia *Cepheidae*, *Mastigidae*, *Cassiopeidae*) si sono raggruppate insieme e separatamente dalla specie appartenenti al subordine delle *Daktylophorae* (*Rhizostomatidae* e *Catostylidae*). Il frammento di 142 bp del gene *COI* utilizzato nella nostra analisi ci ha permesso di identificare inequivocabilmente la maggior parte delle meduse a livello di specie, con un valore bootstrap medio del 98%. Soltanto i campioni PC 20-21-22, etichettati come meduse asiatiche, non sono stati identificati a livello di specie, anche se sono stati collocati nell'Ordine delle *Rhizostomeae*.

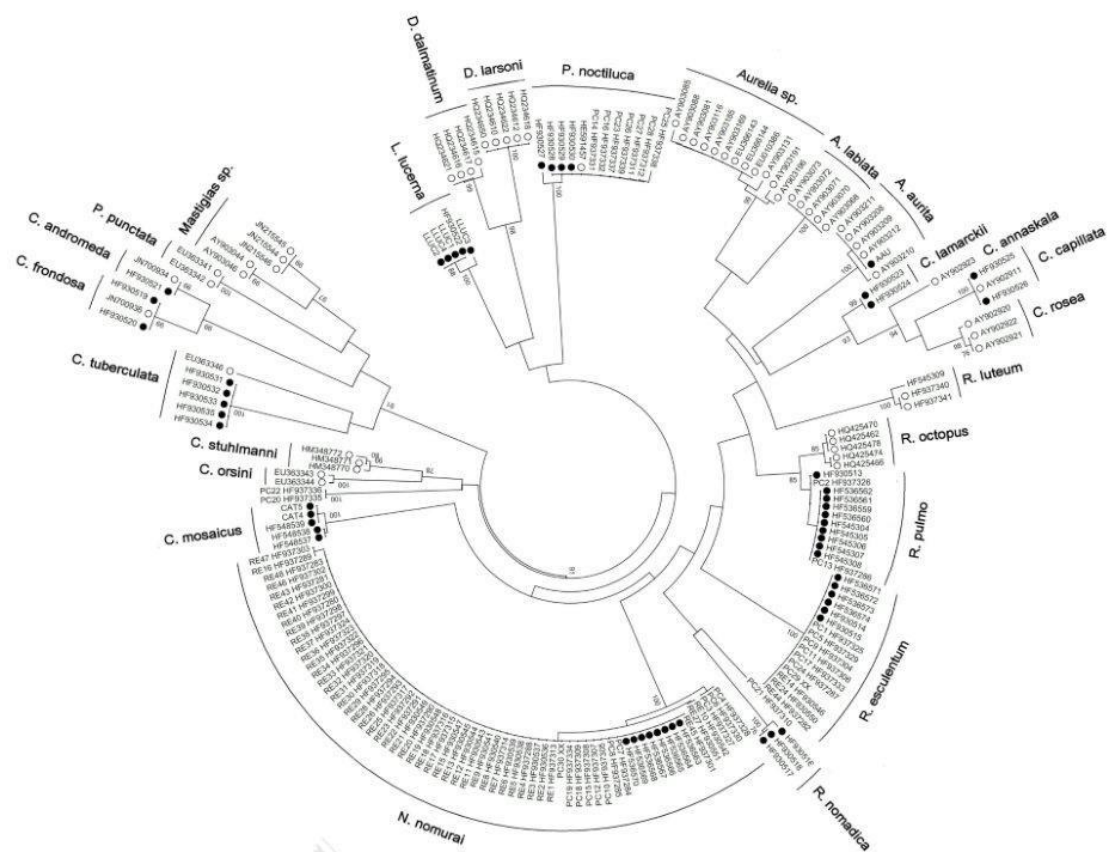


Fig. 7.6: Albero ottenuto utilizzando 192 sequenze di 142pb del gene COI con il metodo Neighbour-joining e modello Kimura 2-p. Sono riportati i valori di bootstrap superiori a 70%. (tratto da: Armani *et al.* 2013 doi:10.1016/j.foodres.2013.10.003)

7.8 MISLABELING

Secondo l'articolo 68 del Regolamento di Esecuzione (UE) n. 404/2011 della Commissione, a partire dal 1 gennaio 2012, per i prodotti della pesca, è diventato obbligatorio riportare in etichetta, o comunque a livello di poster appesi nei punti vendita, la denominazione scientifica della specie, in aggiunta alle già obbligatorie denominazioni commerciali, zone di cattura e metodi di produzione.

La medusa, che fino a poco tempo fa non era contemplata a livello comunitario e nazionale quale prodotto alimentare, rientra adesso a pieno titolo nella lista ufficiale italiana dei prodotti della pesca. La denominazione commerciale provvisoria “medusa asiatica” si riferisce alla sola specie *Rhopilema esculentum*.

Dei 70 campioni acquistati in Italia negli esercizi commerciali e nei ristoranti (sia RE che PC), 46 riportavano in etichetta la dicitura “medusa”. In 3 campioni veniva specificato “medusa asiatica”, che corrisponde alla nuova denominazione commerciale da riportare

obbligatoriamente su questi prodotti. Riguardo alla denominazione scientifica, invece, il 98 % di tutti i prodotti acquistati era etichettato come *Rhopilema esculentum*. 7 campioni non presentavano né la denominazione commerciale né quella scientifica, mentre 14 riportavano in etichetta denominazioni riferibili a prodotti vegetali (Tab.6.2b; Fig. 7.7).

Per quanto riguarda specificatamente i campioni RE, il 94 % è stato identificato come *Nemopilema nomurai*, mentre soltanto il 6 % risultava effettivamente essere *Rhopilema esculentum*, e tali campioni provenivano esclusivamente dai ristoranti. Considerando quindi i soli prodotti RE acquistati negli esercizi al dettaglio, si evidenzia un 100% di *mislabeling*. Riguardo ai prodotti PC, le analisi molecolari hanno permesso di identificarli come *Rhopilema esculentum* (22,7 %), *Nemopilema nomurai* (45,4 %), *Rhizostoma pulmo* (9,1 %) e *Pelagia noctiluca* (9,1 %). La percentuale di errore di etichettatura nei prodotti PC, sebbene inferiore a quella degli RE, è stata del 79%.

Nel corso degli ultimi dieci anni gli stock di *Rhopilema esculentum*, la specie asiatica tradizionalmente sfruttata a scopo alimentare, si sono drasticamente ridotti, molto probabilmente a causa del verificarsi di abbondanti fioriture di altre specie locali, quali *Aurelia aurita*, *Nemopilema nomurai* e *Cyanea capillata* (Dong *et al.*, 2010). *Nemopilema nomurai* è una medusa molto grande, che può raggiungere un diametro di 2 metri ed un peso di 200 kg. Di fronte alla riduzione degli esemplari di *Rhopilema esculentum*, soprattutto nel Mar Giallo e nelle acque di Liaodong Bay, *Nemopilema nomurai* è dunque diventata una delle meduse maggiormente sfruttate (Dong *et al.*, 2010). E' inoltre decisamente probabile che per i prodotti a base di medusa vengano utilizzate molte altre specie autoctone; La preparazione dei prodotti *Ready to eat*, infatti, in cui vengono utilizzate quasi esclusivamente le braccia orali, non necessita di esemplari particolarmente grandi, e quindi è possibile sfruttare anche meduse diverse da quelle tradizionali. A conferma di ciò, nel presente lavoro abbiamo constatato che alcuni campioni, reperiti sia sul mercato italiano che su quello cinese, appartenevano alla specie *Pelagia noctiluca*, medusa ubiquitaria presente anche nelle acque asiatiche.

La possibilità di sostituire specie pregiate con specie più economiche rende il *mislabeling* una pratica conveniente, soprattutto quando il trattamento altera completamente le caratteristiche morfologiche originali della materia prima. Questo principio è stato nuovamente confermato in questo studio, dove *R. esculentum*, la più costosa tra tutte le meduse commestibili, con un prezzo di circa 7 volte superiore a quella di altre specie (Omori & Nakano, 2001), è stato spesso sostituito con la specie *N. nomurai*.

Questo studio, a conferma di quanto già evidenziato in precedenti indagini (Armani *et al.*, 2012c, D'Amico, Armani, Castigliego, Sheng, Gianfaldoni & Guidi, 2014), dimostra come

l'entità delle non conformità di etichettatura raggiunga livelli molto elevati all'interno dei mercati etnici.

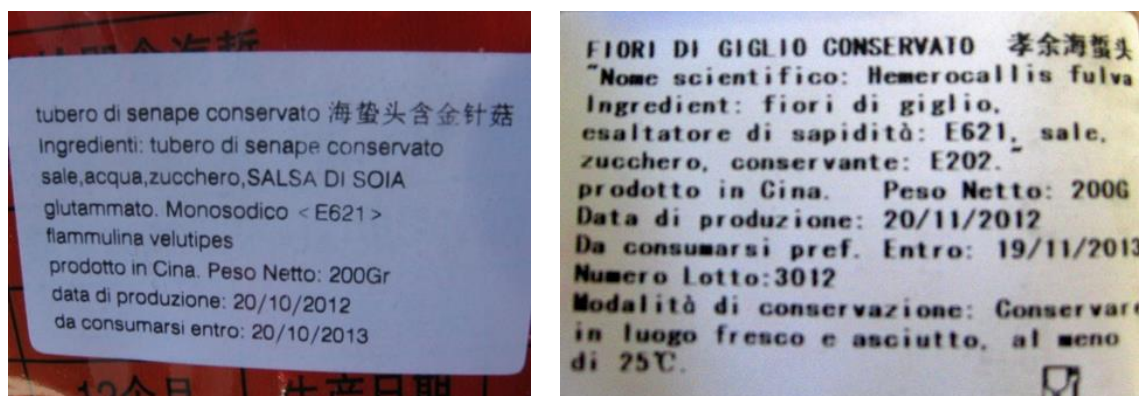


Fig. 7.7: etichetta riportata su un prodotto RE acquistato presso un esercizio commerciale dell'area pratese; la denominazione in lingua italiana e il dettaglio degli ingredienti identificano il prodotto come di origine vegetale, nella stessa etichetta la denominazione in lingua cinese discordante riporta la dizione Hai Zhe tou (testa di medusa)

CAPITOLO 8

CONCLUSIONI

I trattamenti pre-estrattivi sviluppati nel presente lavoro, associati con il sequenziamento del DNA e l'analisi filogenetica di un frammento del gene mitocondriale *COI*, hanno permesso l'identificazione molecolare di specie del 96% dei campioni commerciali, anche per quanto riguarda quelli preconfezionati in salamoia, in cui il DNA risultava altamente degradato a seguito dei trattamenti subiti durante il processo di produzione. Questo tipo di analisi permetterebbe dunque di superare le difficoltà nell'identificazione morfologica dei prodotti della pesca non convenzionali reperibili sul mercato europeo. Inoltre, avendo messo in evidenza un'enorme percentuale di non conformità di etichettatura nei prodotti ittici etnici, potrebbe rivelarsi un valido supporto per i controlli ufficiali sui prodotti della pesca, sventando le frodi commerciali e sanitarie del settore e garantendo la tutela del consumatore.

BIBLIOGRAFIA

1. Katcher, H.L., Schwartz, I. (1994) *A distinctive property of Tth DNA polymerase: Enzymatic amplification in the presence of phenol*. BioTechniques 16:84–92; 2739;
2. AA.VV. (2009): Manuale per buona prassi igienica per la produzione primaria attività di pesca.
http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pagineAree_1187_listaFile_itemName_13_file.pdf
3. Abed-Navandi, D., Kikinger, R. (2007): *First record of the tropical scyphomedusa Phyllorhiza punctata von Lendenfeld, 1884 (Cnidaria: Rhizostomeae) in the Central Mediterranean Sea*. Aquatic Invasions 2:391-394;
4. Agassiz, L. (1862): *Contributions to the Natural History of the United States of America*. Vol. IV, pt. III. Discophorae. pt. IV. Hydroidae. pt. V. Homologies of the Radiata. Boston, London, little, Brown; Trubner, pp. 1-360;
5. Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R., Young, I.G. (1981): *Sequence and organization of the human mitochondrial genome*. Nature, 290:457-465;
6. Arai, N.A. (1997): *A functional biology of scyphozoa*. London, Ed. Chapman & Hall, 1997;
7. Armani, A., Castigliego, L., D’Amico, P., Gianfaldoni, D., Guidi, A. (2011b): *La medusa, dalla produzione alla commercializzazione di un alimento tra novità e tradizione*. Il Pesce 4:137;
8. Armani, A., Castigliego, L., Gianfaldoni, D., Guidi, A. (2011): *L’insicurezza alimentare della nuova ristorazione cinese*. Industrie alimentari, anno 50, n. 514, giugno 2011;
9. Armani, A., Castigliego, L., Guidi, A. (2012): *Review: Fish frauds: the DNA challenge*. CAB reviews 2012 7 n. 71;
10. Armani, A., Castigliego, L., Tinacci, L., Gandini G., Gianfaldoni, D., Guidi, A. (2012b). *A rapid PCR–RFLP method for the identification of Lophius species*. European Food Research and Technologies, 235:253–263;
11. Armani, A., Castigliego, L., Tinacci, L., Gianfaldoni, D., Guidi, A. (2011a): *Molecular characterization of icefish, (Salangidae family), using direct sequencing of mitochondrial cytochrome b gene*. Food Control 22:888-895;
12. Armani, A., Castigliego, L., Tinacci, L., Gianfaldoni, D., Guidi, A. (2012a): *Multiplex conventional and real-time PCR for fish species identification of Bianchetto (juvenile form of Sardina pilchardus), Rossetto (Aphia minuta) and Icefish in fresh, marinated and cooked products*. Food Chemistry 133(1);
13. Armani, A., D’Amico, P., Castigliego, L., Sheng, G., Gianfaldoni, D., Guidi A. (2012c): *Mislabeling of an “unlabelable” seafood sold on the European market: The jellyfish*. Food Control 26:247-251;
14. Armani, A., Tinacci, L., Giusti, A., Castigliego, L., Gianfaldoni, D., Guidi, A. (2013) *“What is inside the jar? Forensically informative nucleotide sequencing (FINS) of*

- a short mitochondrial COI gene fragment reveals a high percentage of mislabeling in jellyfish food products*". Food Research International, doi:10.1016/j.foodres.2013.10.003
15. Asensio, L., Gonzalez, I., Garcia, T., Martin, R. (2008): *Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. Food Control 19(1):1-8;
 16. Avise, J.C. (1986): *Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals*. Philosophical Transaction of the Royal Society London B. 312:325-342;
 17. Baldwin, C.C., Julie, H.M., Smith, D.G., Weigt', L.A. (2009): *Genetic identification and color descriptions of early life-history stages of Belizean Phaeoptyx and Astrapogon (Teleostei: Apogonidae) with Comments on identification of adult Phaeoptyx*. Zootaxa 2008:1-22;
 18. Barlett, S., Davidson, W. (1991): *FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing): a procedure to identifying the animal origin of biological specimens*. Biotechnology 12:408-411;
 19. Bauer, T., Weller, P., Hammes, W.P., Hertel. C. (2003): *The effect of processing parameters on DNA degradation in food*. European Food Research Technology 217:338-343;
 20. Bayha, K.M., Graham, W.M. (2011): *First confirmed reports of the rhizostome jellyfish Mastigias (Cnidaria: Rhizostomeae) in the Atlantic basin*. Aquatic Invasions 6(3):361-366;
 21. Bedry, R., Pillet, O., Rivet, P., Ha, D., Favarel-Garrigues, J.C. (1998): *Epidémiologie des agressions par animaux venimeux marins sur le littoral Atlantique sud pendant la période estivale 1996*. Réan. Urg. 7:375-380;
 22. Benovic, A. (1984): *Appearance of the jellyfish Pelagia noctiluca in the Adriatic Sea during the summer season oh 1983*. Workshop on Jellyfish in the Mediterranean, Athens, Greece, 31 October – 4 November 1983; UNEP: Athens, 1991. pp. 202-211;
 23. Benton, G., Vermeulen, H. (1987): *De Chinezen*. Migranten in de Nederlandse samenleving nr. 4. Muiderberg: Coutinho;
 24. Bergamo, E., Moriconi, S. (2012): *La valutazione del rischio nella catena alimentare*. Attività e organizzazione dell'EFSA - ruolo e interazione del Ministero della Salute – ruolo del Focal Point nazionale, Roma 27 Sett. 2012, www.salute.gov.it/imgs/C_17_notizie_690_listaFile_itemName6_file.pdf ;
 25. Berrini, A., Tepedino, V., Borromeo, V., Secchi, C. (2006): *Identification of freshwater fishcommercially labelled "perch" by isoelectric focusing and two-dimensional electrophoresis*. Food Chemistry 96: 163-168;
 26. Bingel, F., Avsar, D., Gucu, A.C. (1991): *Occurrence of jellyfish in Mersin Bay*. Jellyfish blooms in the Mediterranean. Proceedings of the II Workshop on Jellyfish in the Mediterranean Sea. MAP Technical Reports Series, N. 47. UNEP: Athens, 1991. pp. 65-71;
 27. Bolton, T., Graham, W. (2004): *Morphological variation among populations of an invasive jellyfish*. Marine Ecology Progress Series, 278:125-139. doi:10.3354/meps278125;
 28. Bossier, P. (1999): *Autentication of Seafood by DNA patterns*. Journal of Food Science 64(2):189-193;
 29. Brotz, L. (2011): *Are jellyfish the food of the future?* INFOFISH International4/2011(On-line)

30. Brown, W. M., George, M. Jr, Wilson, A.C. (1979): *Rapid evolution of animal mitochondrial DNA*. Procl. Nat. Acad. Sci. USA 79(4):1967-1971;
31. Burnett, J.W., Calton, G.J., Larsen J.B. (1988): *Significant envenomation by Aurelia aurita, the moon jellyfish*. Toxicon 26(2):215-217;
32. Campagna, M.C., Tepedino, V., Di Domenico, E., Saccares, S., Cavallina, R. (2008): *Identificazione di specie nel settore ittico*. La Rivista di Scienza dell'Alimentazione, n. 1, gennaio-marzo 2008, anno 37;
33. Campana, S.E., Chouinard, G.A., Hanson, J.M., Fréchet A., Bratney J. (2000), *Otolith elemental fingerprints as biological tracers of fish stocks*. Fisheries Research 46(1-3):343-357;
34. Carlton, J.T., Geller, J.B. (1993): *Ecological roulette: the global transport and invasion of nonindigenous marine organisms*. Science 261:78-82;
35. Castiglione, L., Vallone, L., Armani, A., Marzano, M.A., Li, X.N., Fanzone, F., Fusco, S., Facibeni, E., Dragoni, I., Gianfaldoni, D., Guidi, A. (2009): *Microbiological survey on jellyfish food products: preliminary results*. Italian Journal of Food Safety, September 2009, Issue 5;
36. Chen, T.Y., Shian, C.Y., Noguchi, T., Wei, C.I., Hwang, D.F. (2003): *Identification of puffer fish species by native isoelectric focusing technique*. Food Chemistry 83(3):475-479;
37. Civera, T., Bottero, M.T. (2007): *La rintracciabilità nei prodotti della pesca. L'approccio molecolare*. Atti XVII Convegno AIVI, Cesenatico 14-16 giugno, pp. 50-57;
38. Colombo, G.A., Mianzan, H., Madirolas, A. (2003): *Acoustic characterization of gelatinous plankton aggregations: four case studies from the Argentine continental shelf*. Oxford Journals, Life Sciences, ICES Journal of Marine Science, Volume 60, Issue 3, pp. 650-657;
39. Condoleo, R., Marozzi, S., Campagna, M.C., Saccares, S. (2011): *Lotta alle attività illegali nel settore della pesca: strumenti scientifici a sostegno dell'identificazione e della tracciabilità dei prodotti ittici*. Il Pesce n. 6, nov/dic 2011.
40. Costello, J.H., Colin, S.P. (1995): *Flow and feeding by swimming scyphomedusae*. Marine Biology 124:399-406;
41. Cunniff, P. (1995): *Official methods of analysis of AOAC international*. Washington, DC:Association of Official Analytical Chemists, 16th ed, 1995;
42. Cutress, C.E. (1973): *Phyllorhiza punctata in the Tropical Atlantic*. Associations of Island Marine Laboratories of the Caribbean, Cumana 9:14;
43. D'Amico, P., Armani, A., Castiglione, L., Sheng, G., Gianfaldoni, D., & Guidi, A. (2014). *Seafood traceability issues in Chinese food business activities in the light of the European provisions*. Food Control.35 (1): 7-13
44. Dawson, M.N. (2005): *Incipient speciation of Catostylus mosaicus (Scyphozoa, Rhizostomeae, Catostylidae), comparative phylogeography and biogeography in south-east Australia*. Journal of Biogeography, Volume 32, Issue 3, pp. 515-533, March, 2005;
45. Dawson, M.N., Jacobs, D.K. (2001): *Molecular evidence for cryptic species of A. aurita (Cnidaria, Scyphozoa)*. Biol. Bull. 200:92-96;

46. De Giorgi, L. (2002): *Dalla Cina a Vicenza: caratteristiche del flusso migratorio cinese verso l'Europa e l'Italia*. Atti del pomeriggio di studio "Conoscere per capire: l'immigrazione e l'imprenditoria cinese a Vicenza e in Italia". Associazione Artigiani della Provincia di Vicenza, Marzo 2002 pp. 2-9;
47. Deidun, A., Arrigo, S., Piraino, S. (2011): *The westernmost record of *Rhopilema nomadica* (Galil, 1990) in the Mediterranean – off the Maltese Islands*. Aquatic Invasions, Volume 6, Supplement 1:S99-S103. doi:10.3391/ai.2011.6.S1.023;
48. Dong, Z., Dongyan, L., Keesing, J.K. (2010): *Jellyfish blooms in China: Dominant species, causes and consequences*. Marine Pollution Bulletin 60:954-963;
49. EFSA, 2008: *Safety of aluminium from dietary intake. Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Food Contact Materials (AFC)*. The EFSA Journal 754:1-34;
50. Espineira, M., González-Lavin, N., Vieites, J.M., Santaclara, F.J. (2008): *Authentication of Anglerfish Species (*Lophius* spp.) by means of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and forensically informative nucleotide sequencing (FINS) methodologies*. Journal of Agriculture and Food Chemistry 56(22):10594–10599;
51. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2012): *The state of world fisheries and aquaculture*. Rome, 2012.
52. FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations) (1999): <http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS.asp>;
53. FAO/WHO (1995): *Application of risk analysis to food standard issues*. Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation, Geneva, Switzerland, 13-17 march 1995;
54. FAO/WHO (1999): *Risk assessment of microbiological hazards in foods*. Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation, Geneva, Switzerland, 15-19 march 1999;
55. Felsenstein, J. (2004): *PHYLP (PHYLogeny Inference Package)*. Department of Genome Sciences and Department of Biology at the University of Washington <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html> ;
56. Fewkes, J.W. (1887): *A new rhizostomatous medusa from New England*. American Journal of Science, Ser.3, 33:119-125;
57. Focà, A., Lamberti, A.G. (2003): *Metodiche estrattive per la preparazione dei campioni*. Roche_Diagnostics pubblicazioni, EsaDia 13:50-53;
58. Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. (1994): *DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates*. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 3:294-297;
59. Franqueville, C. (1971): *Macroplankton profond (invertébrés) de la Méditerranée nord-occidentale*. Tethys 3:11-56;
60. Fuentes, V., Straehler-Pohl, I., Atienza, D., Franco, I., Tilves, U., Gentile, M., Acevedo, M., Olariaga, A., Gili, J.M. (2011): *Life cycle of the jellyfish *Rhizostoma pulmo* (Scyphozoa: Rhizostomeae) and its distribution, seasonality and inter-annual variability along the Catalan coast and the Mar Menor (Spain, NW Mediterranean)*. Marine Biology 158(10):2247-2266;
61. Fuller, P. (2005): *Phyllorhiza punctata*. Nonindigenous Aquatic Species Database, Gainesville, FL (On-line);

62. Galil, B.S., Shoval, L., Goren, M. (2009): *Phyllorhiza punctata* von Lendenfeld, 1884 (Scyphozoa: Rhizostomeae: Mastigiidae) reappeared off the Mediterranean coast of Israel. *Aquatic Invasions* 4:481-483. <http://dx.doi.org/10.3391/ai.2009.4.3.6> ;
63. Galil, B.S., Spanier, E., Ferguson, W.W. (1990): *The scyphomedusae of the Mediterranean coast of Israel, including two Lessepsian migrants new to the Mediterranean*. *Zoologische Mededelingen (Leiden)* 64:95-105;
64. Galimberti, A., De Mattia, F., Losa, A., Bruni, I., Federici, S., Casiraghi, M., Martellos, S., Labra, M. (2013): *DNA Barcoding as a new tool for food traceability*. *Food Research International*, 50(1):55-63;
65. Gao, S., Hong, H., Zhang, S. (2002): *Fauna Sinica Invertebrata 27. Phylum Cnidaria, Class Hydrozoa, Subclass Siphonophorae, Class Scyphomedusae*. Science Press, Beijing, pp. 272 (in Chinese);
66. Giordano, R. Costantini, S. (1993). "Some aspects related to the presence of aluminium in waters". *Ann. Ist. Super. Sanità* 29 (2):305-311;
67. Graham, W.M., Martin, D.L., Felder, D.L., Asper, V.L., Perry, H.M. (2003): *Ecological and economic implications of a tropical jellyfish invader in the Gulf of Mexico*. *Biological Invasions* 5:53-69. doi: 10.1023/A:1024046707234;
68. Grahl-Nielsen, O. (2005): *Fatty Acid Profiles as natural Marks for Stock Identification*. in Cadrin, S.X., Friedland, K.D., Waldman, J.R. (Eds.), *Stock Identification Methods: Applications in Fishery Science*, 1st Edition, London, Elsevier Academic Press.
69. Griffin, B.D., Murphy, T. (2011): *Cannonball jellyfish: Stomolophus meleagris*. Disponibile On-line: <https://www.dnr.sc.gov/cwcs/pdf/Cannonballjellyfish.pdf>;
70. Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C., Gelbart, W.M. (2000): *An introduction to genetic analysis*. 7th Edition, New York: W.H. Freeman.
71. Guan, S., Zhan, P.G., Liu, C.Y (2004): *Pond cultivation state, existing problem and successful example of Rhopilema esculenta of Liaoning Province*. *Fish Sci* 23(8):30-31 (in Chinese);
72. Guenzi, S. (2000): *Le analisi post-PCR*. *Laboratorio* 2000 78-86;
73. Guidi, A., Castiglione, L., Armani, A. (2008): *Diagnostica analitica degli alimenti*. In Colavita G. *Igiene e Tecnologie degli alimenti di origine animale ed Point Veterinarie*, Italia, Milano;
74. Gulsahin, N., Tarkan, A.N. (2011): *The first confirmed record of the alien jellyfish Rhopilema nomadica Galil 1990 from the southern Aegean coast of Turkey*. *Aquatic Invasions* 6, Suppl. 1:S95-97. <http://dx.doi.org/10.3391/ai.2011.6.S1.022> ;
75. Haddad, M.A., Nogueira, M. Jr (2006): *Reappearance and seasonality of Phyllorhiza punctata von Lendenfeld (Cnidaria, Scyphozoa, Rhizostomeae) medusae in southern Brazil*. *Revista Brasileira de Zoolgia*, 23(3):824-831. doi:10.1590/S0101-81752006000300030
76. Hajibabaei, M., Smith, A., Janzen, D.H., Rodriguez, J.J., Whitfield, J.B., Hebert, P.D. (2006) *A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded*. *Molecular Ecology Notes* 6:959-964;
77. Hale, G. (1999): *The Classification and Distribution of the Class Scyphozoa*. (On-Line) <http://gladstone.uoregon.edu/~ghale/pdf/scyphozoa.pdf>;
78. Hamza, A. (1990): *Sur la prolifération des méduses sur certaines cotes Tunisiennes*. *Rapp. Doc. Inst. Nat. Sc. Tech. Océanogr. Pêche Salambo* 3:1-9;

79. Hattori, S. (1893): *Edible jellyfish in Saga Prefecture*. Dobutsugaku Zasshi, Tokyo 5(59):342-345 (in Japanese);
80. Hebert, P.D., Ratnasingham, S., DeWaard, J.R. (2003) *Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species*. Biological Sciences 270 (1):96–99;
81. Hemmer, W. (2002): *Food derived from genetically modified organisms and detection methods*. BATS report 2/97, Agency for Biosafety Research and Assessment of Technology Impacts of the Swiss Priority Programme Biotechnology of the Swiss Science Foundation, Basel, Switzerland, 2002;
82. Henroth, L., Groendahl, F. (1985): *On the biology of A. aurita. Predation by Coryphella verrucosa (Gastropoda, Opisthobranchia), a major factor regulating the development of Aurelia populations in the Gullmar Fjord, western Sweden*. Ophelia 24:37-45;
83. Herut, B., Galil, B.S. (2000): *The coast of Israel, southeast Mediterranean*. Sheppard, C.R.C. (Ed)(2000). Seas at the millennium: an environmental evaluation: 1 Regional chapters: Europe, The Americas and West Africa. pp. 253-265;
84. Hickman, C.P.Jr, Roberts, L.S., Larson, A. (2001): *Integrated principles of zoology, eleventh edition*. New York, Ed. McGraw-Hill Companies, Inc., 2001(2nd edition);
85. Holland, B.S., M.N. Dawson, G.L. Crow, D.K. Hoffmann (2004): *Global phylogeography of Cassiopea (Scyphozoa: Rhizostomeae): Molecular evidence for cryptic species and multiple Hawaiian invasions*. Marine Biology. 145:1119-1128;
86. Hong, H., Zhang, S., Wang, C. (1978): *Hai tsue (edible jellyfish)*. Science Publications, Beijing, 70 pp. (in Chinese);
87. Hooper, S.N., Ackman, R.G. (1973): *Distribution of trans-6-hexadecenoic acid, 7-methyl-7- hexadecenoic acid and common fatty acid in lipids of the ocean sunfish Mola mola*. Lipids 8:509-516;
88. Hsieh, Y.P., Leong, F.M., Barnes, K.W. (1996): *Inorganic constituents in fresh and processed cannonball jellyfish (Stomolophus meleagris)*. J. Agric. Food. Chem. 44:3117-3119;
89. Hsieh, Y.P., Leong, F.M., Rudloe, J. (2001): *Jellyfish as food*. Hydrobiologia 451 (Dev. Hydrobiol. 155):11-17;
90. Hsieh, Y.P., Rudloe, J. (1994): *Potential of utilizing jellyfish as food in Western countries*. Trends in Food Science and Technology 5(7):225-229;
91. Huang, Y. W. (1988). *Cannonball jellyfish, Stomolophus meleagris as a food resource*. J. Food Sci. 53:341–343;
92. Humann, P. (1922): *Reef creature identification*. Florida, Caribbean, Bahamas. N. Deloach (ed), New World Pub, Jacksonville, pp 1-320;
93. Jacobsen, C.S., Rasmussen, O.F. (1992): *Development and application of a new method to extract bacterial DNA from soil based on separation of bacteria from soil with cation-exchange resin*. Appl Environ Microbiol 58(8):2458-2462;
94. Kawahara, M., Uye, S.I., Ohtsu, K., Lizumi, H. (2006): *Unusual population explosion of the giant jellyfish Nemopilema nomurai (Scyphozoa: Rhizostomeae) in East Asian waters*. Marine Ecology Progress Series 307:161-173;

95. Kideys, A.E., Gucu, A.C. (1995): *Rhopilema nomadica*: A *Lessepsian scyphomedusan* new to the Mediterranean coast of Turkey. Israel Journal of Zoology 41(4):615-617;
96. Kishinuoye, K. (1890): *Bizen kurage*. *Rhopilema* sp. Dobutsugaku Zasshi, Tokyo 2(16):47-54 (in Japanese);
97. Kishinuoye, K. (1891): *Bizen kurage*. *Rhopilema esculenta*. Dobutsugaku Zasshi, Tokyo 3(28):53 (in Japanese);
98. Kishinuoye, K. (1922): *Echizen kurage*, *Nemopilema nomurai*. Dobutsugaku Zasshi, Tokyo 34:343-346 (in Japanese);
99. Kitamura, M. (2003): *Taxonomy of edible jellyfish in Southeast Asia*. Umiushi-tsuushin 38:2-5 (in Japanese);
100. Kitamura, M., Omori, M. (2010): *Synopsis of edible jellifishes collected from Southeast Asia, with notes on jellyfish fisheries*. Plankton Benthos Res 5(3): 106-118, 2010;
101. Knuutinen, J., Harjula, P. (1998): *Identification of fish species by reversed-phase high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection*. Science and Applications 705(1):11-21;
102. Kochzius, M., Seidel, C., Antoniou, A., Kumar Botla, S., Campo, D., Cariani, A. (2010): *Identifying fishes through DNA barcodes and microarrays*. PLoS ONE 5:12620;
103. Kramp, P.L. (1955) *The medusae of the tropical west coast of Africa*. Atl Rep 3:239-324;
104. Kramp, P.L. (1959) *Medusae, mainly from the west coast of Africa*. Mém Inst Sci Nat Belg 3:1-33;
105. Kramp, P.L. (1961): *Synopsis of the medusae of the world*. Journal of Marine Biology Association of the UK 40:7-469;
106. Kwetegyeka, J., Mpango, G., Grahl-Nielsen, O. (2008). *Variation in fatty acid composition in muscle and heart tissues among species and populations of tropical fish in Lakes Victoria and Kyoga*. Lipids 43:1017-1029.
107. Kwong, P. (2007): *Chinese migration goes global*. YaleGlobalOnline, July 2007 <http://yaleglobal.yale.edu/content/chinese-migration-goes-global> ;
108. Lago, F.C., Vieites, J.M., Espineira, M. (2012): *Development of a FINS- based method for the identification of skates species of commercial interest*. Food Control 24(1-2):38-43;
109. Lantz, P.G., Al-Soud, W.A., Knutsson, R., Hahn-Hagerdal, B., Radstrom, P. (2000): *Biotechnical use of polymerase chain reaction for microbiological analysis of biological samples*. Biotechnology Annual Review 5:87-130;
110. Legge 30 dicembre 1986 n. 943 *Norme in materia di collocamento e di trattamento dei lavoratori extracomunitari immigrati e contro le immigrazioni clandestine*, G.U. n. 8 del 12 gennaio 1987;
111. Li, J.R., Hsieh, Y-H. P. (2004): *Traditional Chinese food technology and cuisine*. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition 13(2):147-155;
112. Lindahl, T. (1993): *Instability and decay of the primary structure of DNA*. Nature 362(6422):709-715;
113. Lindahl, T., Nyberg, B. (1972): *Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid*. Biochemistry 11(19):3610-3618;

114. Loffert, D. (1997): *PCR: Effects of template quality*. Qiagen News 1:8–10;
115. Lotan, A., Fine, M., Ben-Hillel, R. (1994): *Synchronization of life cycle and dispersal pattern of the tropical invader scyphomedusa *Rhopilema nomadica* is temperature dependent*. Marine Ecology Progress Series 109:59-65.
<http://dx.doi.org/10.3354/meps109059> ;
116. Manfrin, G., Piccinetti, C. (1983): *Distribution de *Pelagia noctiluca* (Forsk.) en Méditerranée dans l'été 1983*. Workshop on Jellyfish Blooms in the Mediterranean, Athens, Greece, 31 October – 4 November, 1983; UNEP: Athens, 1984; pp. 25-32;
117. Mariottini, G.L., Giacco, E., Pane, L. (2008): *The Mauve Stinger *Pelagia noctiluca* (Forsskal, 1775). Distribution, Ecology, Toxicity and Epidemiology of Stings. A Review*. Marine Drugs 6(3):496-513;
118. Mariottini, G.L., Pane, L. (2010): *Mediterranean jellyfish venoms: a review on scyphomedusae*. Marine Drugs 8:1122-1152;
119. Markoulatos, P., Siafakas, N., Moncany, M. (2002): *Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach*. J Clin Lab Anal 16(1):47-51;
120. Martin, L.E. (1999): *The population biology and ecology of *Aurelia* sp. (Scyphozoa: Semaestomeae) in a tropical meromictic marine lake in Palau, Micronesia*. Ph.D. thesis, University of California, Los Angeles: 250 pp.
121. Martinsohn, J.T. (2011): *Deterring illegal activities in the fisheries sector- Genetics, genomics, chemistry and forensics to fight iuu fishing and in support of fish product traceability*. European Commission - Joint Research Centre Reference Report EUR 24394 EN – 2011;
122. Mathews, C.K., van Holde, K.E., Ahern, K.G. (2004): *Biochimica*. Milano, Casa Editrice Ambrosiana, giugno 2004;
123. Mianzan, H.W. (1986): *Estudio sistemático y bioecológico de algunas medusas Scyphozoa de la región subantártica*. PhD, La Plata;
124. Mianzan, H.W., Ramirez, F.C., Costello, J.H., Chiaverano, L. (2005): *Un mar de gelatina?* Ciencia Hoy 15:48-55;
125. Mills, C.E. (2001): *Jellyfish blooms: are populations increasing globally in response to changing ocean conditions?* Hydrobiologia 451:55-68;
126. Minchin, D. (1996): *Tar pellets and plastics as attachment surfaces for lepadid cirripedes in the North Atlantic Ocean*. Mar. Poll. Bull. 32:855-859;
127. Minella, A. (2000): *L'immigrazione cinese nella provincia di Venezia*, Tesi di Laurea, Facoltà di Lingue e Letterature Straniere, Università degli Studi Ca'Foscari, Venezia;
128. Moreira, M. (1961): *Sobre *Mastigias scintillae* sp. nov. (Scyphomedusae, Rhizostomeae) das costas do Brasil*. Boletim do Instituto Oceanografico da Universidade de Sao Paulo, 11:5-30;
129. Moser, M., Kniel, J., Schmitz-Winnenthal, C., Hupfer, K., Engel, H. (1999): *Einfluss verfahrenstechnischer parameter auf den analytischen nachweisngentechnischen veränderter zutaten in backwaren*. Getreide Mehl und Brot 53:334-341;
130. Nishikawa, J., Thu, H.H., Ha, T.M., Thu, P.T. (2008): *Jellyfish fisheries in northern Vietnam*. Plankton Benthos Res 3:227-234;

131. Omori, M., Kitamura, M. (2004): *Taxonomic review of three Japanese species of edible jellyfish (Scyphozoa: Rhizostomeae)*. Plankton Biology and Ecology Journal 51:36-51;
132. Omori, M., Nakano, E. (2001): *Jellyfish fisheries in southeast Asia*. Hydrobiologia 451:19-26;
133. Ozturk, B., Isinibilir, M. (2010): *An alien jellyfish Rhopilema nomadica and its impacts to the Eastern Mediterranean part of Turkey*. Journal Black Sea/Mediterranean Environment 16(2):149-156;
134. Pepe, T., Trotta, M., Di Marco, I. (2007): *Fish species identification in surimi-based*
135. Perry, H., Larsen, K. (2004): *Picture Guide to Shelf Invertebrates of the Northern Gulf of Mexico*. NOAA National Marine Fisheries Service (On-line)
136. Pitt, K.A. & Kingsford, M.J. (2000): *Reproductive biology of the edible jellyfish Catostylus mosaicus (Rhizostomeae)*. Marine Biology (2000) 137:791-799;
137. Pitt, K.A., Koop, K., Rissik, D. (2005): *Contrasting contributions to inorganic nutrient recycling by the co-occurring jellyfishes, Catostylus mosaicus and Phyllorhiza punctata (Scyphozoa, Rhizostomeae)*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 315:71-86;
138. Poole, S., Edwards, J., Naidoo, R. (2002): *How to create a shelf stable marinated jellyfish product from the underutilized species "Catostylus mosaicus"*. (On-line) Seafood Services Australia <https://seafood.net.au/downloads/PDF-RD520.pdf>;
139. Powell, H.A. (1994): *Proteinase inhibition of the detection of Listeria monocytogenes in milk using the polymerase chain reaction*. Lett Appl Microbiol 18:59-61;
140. Prieto, L., Armani, A., Macias, D. (2013): *Recent strandings of the giant jellyfish Rhizostoma luteum Quoy & Gaimard 1827(Cnidaria: Scyphozoa: Rhizostomeae) on the Atlantic and Mediterranean coasts*. Marine Biology doi:[10.1007/s00227-013-2293-6](https://doi.org/10.1007/s00227-013-2293-6) ;
- products. J Agric Food Chem 55:3681–3685;
141. Punzo, F. (1977): *The pH of body fluids from marine intertidal invertebrates*. J Exp Mar Biol Ecol. 30:327-331;
142. Qiu Kuan, W., Ming, Y.Y., Zhenmin, L., Guo Quin, Z., Shu Mei, J. (1995): *Chemical Sterilizing Solution Used for Sterilizing Slices of Desalted Dried Jellyfish in Soft can*. Journal of Dalian fisheries college 4:33-37;
143. Quoy, J.R.C., Gaimard, J.P. (1827): *Observations zoologiques faites à bord de l'Astrolabe en mai 1826, dans le détroit de Gibraltar*. Annales des sciences naturelles Paris 10:175;
144. Rådström, P., Knutsson, R., Wolffs, P., Lövenklev, M., Löfström, C. (2004): *Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples*. Mol Biotechnol. 26(2):133-46;
145. Ramšak, A., Stopar, K., Malej, A. (2012) *Comparative phylogeography of meroplanktonic species, Aurelia spp. and Rhizostoma pulmo (Cnidaria: Scyphozoa) in European seas*. Hydrobiologia (Den Haag) p. 1-12;
146. Ranson, G. (1925): *Quelques observations sur le plankton et liste des méduses recueillies par "la tanche" pendant la croisière de 1924*. Bull. Mus. Nat. His. Nat. 31:379-382;
147. Ranson, G. (1949): *Resultats scientifiques des croisières du navire école belge "Mercator" IV. 2. Méduses*. Mém Inst Sci Nat Belg 2:121–158;

- 148.** Rasmussen Hellberg, R.S., Morrissey, M.T., Hanner, R.H. (2010): *A multiplex PCR method for the identification of commercially important salmon and trout species (Oncorhynchus and Salmo) in North America*. Journal of Food Science 75(7):595–606; *reassessment and possible applications*. Rev Fish Biol Fisheries 19:265–293;
- 149.** Rehbein H. (2003): *Identification of fish species by protein and DNA-analysis*. In Perez-Martin R., Soleto C.G. (Eds.), *Authenticity of species in meat and seafood products*, Association “International Congress on Authenticity of Species in Meat and Seafood Products”;
- 150.** Rijpens, N.P., Jannes, G., Van Asbroeck, M., Rossau, R., Herman, L.M. (1996): *Direct detection of Brucella spp. In raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes*. Appl Environ Microbiol 62(5):1683-1688;
- 151.** Robertson, J.D. (1939). The Journal of Experimental Biology, 16:387-397;
- 152.** Rossen, L., Norskow, P., Holmstrom, K., Ramussen, O.F. (1992): *Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions*. Int J Food Microbiol 17(1):37-45;
- 153.** Rudloe, J. (1992): *Jellyfish: a new fishery for the Florida panhandle*. A report to the U.S. Department of Commerce Economic Development Administration. EDA Project n. 04-06-03801, pp. 35;
- 154.** Russell, F.S. (1970): *The Medusae of the British Isles*. Vol. II – Pelagic Scyphozoa, with a supplement to Vol. I. Cambridge: Cambridge University Press.
- 155.** Saccone, C., De Giorgi, C., Gissi, C., Pesole, G., Reyes, A. (1999): *Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model*. Gene 238(1):195-209;
- 156.** Sakinan, S. (2011): *Recent occurrence of indopacific jellyfish Rhopilema nomadica in North-Eastern Levantine Sea. First National Workshop on jellyfish and Other Gelatinous Species in Turkish Marine Waters*. Turkish Marine Research Foundation, Istanbul, Turkey, 35:73-77;
- 157.** Sanger. F., Nicklen, S., Coulson, R. (1977): *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci USA 74(12):5463-5467;
- 158.** Schembri, P.J., Deidun, A., Vella, P.J. (2010): *First record of Cassiopea andromeda (Scyphozoa: Rhizostomeae: Cassiopeidae) from the central Mediterranean Sea*. Marine Biodiversity Records 3: e6; doi:10.1017/S1755267209990625;
- 159.** Schiariti, A., Christiansen, E., Carrara Morandini, A., Lang da Silveira, F., Giberto, D.A. & Mianzan, H.W. (2012): *Reproductive biology of Lychnorhiza lucerna (Cnidaria: Scyphozoa: Rhizostomeae): Individual traits related to sexual reproduction*. Marine Biology Research, 8:3, 255-264;
- 160.** Schiariti, A., Kawahara, M., Uye, S., Mianzan, H.W. (2008); *Life cycle of the jellyfish Lychnorhiza lucerna (Scyphozoa: Rhizostomeae)*. Marine Biology Volume 156, Issue 1, pp. 1-12;
- 161.** Scialpi, A., Mengoni, A. (2008): *La PCR e le sue varianti*. Quaderno di laboratorio, Firenze University Press, 2008, Manuali Scienze 2.
- 162.** Shimomura, T. (1959): *On the unprecedented flourishing of “Echizen kurage” Stomolophus nomurai (Kishinouye), in the Tsushima current regions in autumn, 1958*. Bull Jpn Sea Reg Fish Res Lab 7:85-107 (in Japanese with English abstract);

163. Silveira, F.L., Cornelius, P.F.S. (2000): *New observations on medusae (Cnidaria, Scyphozoa, Rhizostomeae) from the northeast and south Brazil*. Acta Biologica Leopoldensia 22:9-18;
164. Single Laboratory Validated Method for DNA-Barcoding for the Species Identification of Fish for FDA Regulatory Compliance (2011). Available from: URL: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm237391.htm>
165. Siokou-Frangou, I., Sarantakos, K., Epaminondas, D.C. (2006): *First record of the scyphomedusa Rhopilema nomadica Galil 1990 (Cnidaria: Scyphozoa: Rhizostomeae) in Greece*. Aquatic Invasions 1:194-195. <http://dx.doi.org/10.3391/ai.2006.1.3.17> ;
166. Sloan, N.A., Gunn, C.R. (1985): *Fishing, processing and marketing of jellyfish (Aurelia aurita), from Southern British Columbia*. Canadian Industry Report of Fisheries and Aquatic Sciences n. 157;
167. Song, H., Buhay, J.E., Whiting, M.F., Crandall, K.A. (2008): *Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 150:13486-13491;
168. Steffens, D.L., Sutter, S.L., Roemer, S.C. (1993): *An alternate universal forward primer for improved automated DNA sequencing of M13*. Biotechniques 15(4):580–582;
169. Sterrer, W. (1986): *Marine fauna and flora of Bermuda. A systematic guide to the identification of marine organisms*. John Wiley & Sons, Inc. pp 158-159;
170. Sterrer, W. (1992): *Bermuda's marine life*. Bda. Zool. Soc., Island Press, Bda. Pp. 43-44;
171. Stiasny, G. (1931) *Die Rhizostomeen. Sammlung des British Museum (Natural History) in London*. Zool. Meded 14:137–178;
172. Stiasny, G. (1933): *Über einige Entwicklungsstadien von Rhopilema hispidum (Vanhoffen) Maas*. Zool. Meded. 15:162-174;
173. Stiasny, G. (1936) *Rhizostoma luteum (Quoy und Gaimard), in Tejovor Lissabon nach-gewiesen*. Arch Mus Bocage 7:1–6;
174. Stiasny, G. (1939): *Über einige Scyphomedusen von Kamaran (Rotes Meer)*. Zool. Anz. 128:17-23;
175. Tamura, K., Nei, M., Kumar, S. (2004): *Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method*. Proc Natl Acad Sci USA 101:11030–11035;
176. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011): *MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods*. Mol Bio Evol 28:2731-
177. Teletchea, F. (2009): *Molecular identification methods of fish species*:
178. Turk, V., Lucic, D., Flander-Putrlle, V., Malej, A. (2008): *Feeding of Aurelia sp. (Scyphozoa) and links to the microbial food web*. Marine Ecology 29:495-505
179. Uchida, T. (1927): *Report of the biological survey of Mutsu Bay. 2. Medusae of Mutsu Bay*. Science Report Tohoku University, Biol. 2:215-238;
180. Uchida, T. (1936): *Class Scyphozoa*. Fauna Nipponica 3(2), Sanseido, Tokyo, pp. 1-94 (in Japanese);
181. Uchida, T. (1954): *Distribution of Scyphomedusae in Japanese and its adjacent waters*. Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University, Ser. 6, Zool. 12:209-219;

182. Uye, S. (2008): *Blooms of the giant jellyfish Nemopilema nomurai: a threat to the fisheries of the East Asian Marginal Seas*. Plankton and Benthos Research, 3:125-131;
183. Van der Baan, S.M. (1967): *Pelagia noctiluca (Forskal) collected off the Dutch coast*. Neth. J. Sea Res. 3:601-604;
184. Van der Baan, S.M. (1969): *Second note on the occurrence of Stomatopod larvae in the North Sea near the lightship*. Neth. J. Sea Res. 4:350-353;
185. Vanhoffen, E. (1888): *Untersuchungen uber semastome und rhizostome Medusen*. Bibliotheca Zoologica, Stuttgart 1(3):1-52;
186. Wadowsky R. M., Laus S., Libert T., States S. J. , Ehrlich G. E. (1994): *Inhibition of PCR-based assay for Bordetella pertussis by using calcium alginate fiber and aluminum shaft components of a nasopharyngeal swab*. Journal of Clinical Microbiology 32(4):1054-1057;
187. Waldinger, R., Tseng, Y. (1992): *Divergent Diasporas: The Chinese Communities of New York and Los Angeles Compared*. New York, Russell Sage Foundation;
188. Wang, G. (1993): *The Chinese Entrepreneur and his Cultural Strategies*. The Straits Times, p.26. Relazione presentata alla Second World Chinese Entrepreneur Convention, Hong Kong, Novembre 1993;
189. Warde, A. (1999): *Convenience food: space and timing*. British Food Journal 101(7):518-527;
190. Weyant, R.S., Edmonds, P., Swaminathan, B. (1990): *Effect of ionic and nonionic detergents on the Taq polymerase*. Biotechniques 9(3):308-309;
191. Wilson, I.G. (1997): *Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification*. Applied and Environmental Microbiology 63(10):3741-3751;
192. Wolstenholme, D.R. (1992): *Animal mitochondrial DNA: structure, and evolution*. Mitochondrial Genomes, International Review of Cytology, New York, edited by D.R. Wolstenholme and K.W Jeon 141:173-216;
193. Wong, W. W. K., Chung, S. W. C., Kwong, K. P., Yin Ho, Y., & Xiao, Y. (2010). *Dietary exposure to aluminium of the Hong Kong population*. Food Additives & Contaminants, 27(4):457- 463;
194. Wootton, M., Buckle, K.A., Martin, D. (1982): *Studies on the preservation of Australian jellyfish (Catostylus spp.)*. Food Tech. Aust. 34:398-400;
195. Wu J., Du F., Zhang P., Khan, I. A., Chen J., Liang Y. (2005). *Thermodynamics of the interaction of aluminum ions with DNA: Implications for the biological function of aluminum*. Journal of inorganic biochemistry 99:1145-1154;
196. Wu, B.L. (1955): *Hai-tsue (Rhopilema esculentum)*. Sheng Fu Xie Tong Bao (Biological Newsletter) 4:35-40 (in Chinese);
197. Xie, Z.M., Wang, Y.X., Huang, M.X. (2004): *Technology of jellyfish (R.esculentum) culture and enhance*. Jin Dun Publ, Beijin (in Chinese);
198. Yasuda, T. (2004): *On the unusual occurrence of the giant medusa Nemopilema nomurai in Japanese waters*. Nippon Suisan Gakkaishi 70:380-386 (in Japanese);
199. You, K., Ma, C., Gao, H., Li, F., Zhang, M., Qiu, Y., Wang, B. (2007): *Research on the jellyfish (Rhopilema esculentum Kishinouye) and associated aquaculture techniques in China: current status*. Aquaculture International 15:479-488;

- 200.** Zanfrini, L. (2001): *La programmazione dei flussi per motivi di lavoro*. In Fondazione Cariplo-ISMU, Sesto Rapporto sulle Migrazioni 2000, Franco Angeli, Milano, pp. 181-210;
- 201.** Zhuang, Y., Hou, H., Zhao, X., Zhang, Z., Li, B. (2009): *Effects of collagen and collagen hydrolysate from jellyfish (Rhopilema esculentum) on mice skin photoaging induced by UV irradiation*. Journal of Food Science 74(6):183-188.

RIFERIMENTI NORMATIVI

- **Decreto Legislativo n. 193/2007** del 6 novembre 2007 “*Attuazione della direttiva 2004/41/CE relativa ai controlli in materia di sicurezza alimentare e applicazione dei regolamenti comunitari nel medesimo settore*”. G.U. n. 261 del 9 novembre 2007;
- **Decreto Legislativo n. 7/2007** del 31 gennaio 2007 “*Recante misure urgenti per la tutela dei consumatori, la promozione della concorrenza, lo sviluppo di attività economiche e la nascita di nuove imprese*”. G.U. n. 26 del 1 febbraio 2007;
- **Decreto Legislativo n. 114/2006** del 8 febbraio 2006 “*Attuazione delle direttive 2003/89/CE, 2004/77/CE e 2005/63/CE in materia di indicazione degli ingredienti contenuti nei prodotti alimentari*”. G.U. n. 69 del 23 marzo 2006;
- **Decreto Legislativo n. 181/2003** del 23 giugno 2003 “*Attuazione della direttiva 2000/13/CE concernente l'etichettatura e la presentazione dei prodotti alimentari, nonché la relativa pubblicità*”. G.U. n.167 del 21 luglio 2003;
- **Decreto Legislativo n. 77/93** del 16 febbraio 1993 “*Attuazione della direttiva 90/496/CEE del Consiglio del 24 settembre 1990 relativa all'etichettatura nutrizionale dei prodotti alimentari*”. G.U. n. 69 del 24 marzo 1993;
- **Decreto Legislativo n. 531/1992** del 30 dicembre 1992 “*Attuazione della direttiva 91/493/CEE che stabilisce le norme sanitarie applicabili alla produzione e commercializzazione dei prodotti della pesca, tenuto conto delle modifiche apportate dalla direttiva 92/48/CEE che stabilisce le norme igieniche minime applicabili ai prodotti della pesca ottenuti a bordo di talune navi*”. G.U. n. 7 del 11 gennaio 1993;
- **Decreto Legislativo n. 111/92** del 17 febbraio 1992 “*Attuazione della direttiva 89/398/CEE concernente i prodotti alimentari destinati ad una alimentazione particolare*”. G.U. n. 39 del 17 febbraio 1992;
- **Decreto Legislativo n. 109/92** del 27 gennaio 1992 “*Attuazione delle direttive n. 89/395/CEE e n. 89/396/CEE concernenti l'etichettatura, la presentazione e la pubblicità dei prodotti alimentari*”. G.U. n. 39 del 17 febbraio 1992;
- **Decreto MIPAAF 12 agosto 2011** “*Attribuzione della denominazione in lingua italiana di alcune specie ittiche, che integra e modifica l'elenco allegato al DM del 31 gennaio 2008 e al DM del 23 dicembre 2010*”. G.U. n. del
- **Decreto MIPAAF 23 dicembre 2010** “*Denominazione in lingua italiana delle specie ittiche di interesse commerciale – modifiche ed integrazioni del DM del 31 gennaio 2008 successivamente modificato e integrato dal DM del 5 marzo 2010*”. G.U. n.11 del 15 gennaio 2011;
- **Decreto MIPAAF 5 marzo 2010** “*Denominazione in lingua italiana delle specie ittiche di interesse commerciale – modifiche ed integrazioni dell'elenco allegato al decreto 27 marzo 2002 e successive modifiche e integrazioni*”. G.U. n. del
- **Decreto MIPAAF (Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali) 31 gennaio 2008** “*Denominazione in lingua italiana delle specie di interesse*

commerciale – modifiche ed integrazioni dell'elenco di cui al decreto 25 luglio 2005". G.U. n. 45 del 22 febbraio 2008;

- **Decreto MIPAF (Ministero delle Politiche Agricole e Forestali) 25 luglio 2005** *"Modifiche ed integrazioni all'elenco delle denominazioni commerciali dei prodotti ittici, allegati al Decreto ministeriale del 14 gennaio 2005"* G.U. n. 181 del 5 agosto 2005;
- **Decreto MIPAF (Ministero delle Politiche Agricole e Forestali) 14 gennaio 2005** *"Denominazione in lingua italiana delle specie ittiche di interesse commerciale ai sensi del Regolamento (CE) n. 2065/2001 della Commissione del 22 ottobre 2001"*. G.U. n. 33 del 10 febbraio 2005;
- **Decreto MIPAF (Ministero delle Politiche Agricole e Forestali) del 27 marzo 2002** *"Etichettatura dei prodotti ittici e sistema di controllo"*. G.U. n. 84 del 10 aprile 2002;
- **Direttiva 2006/88/CE del Consiglio del 24 ottobre 2006** *"relativa alle condizioni di polizia sanitaria applicabili alle specie animali d'acquacoltura e ai relativi prodotti, nonché alla prevenzione di alcune malattie degli animali acquatici e alle misure di lotta contro talune malattie"*. G.U. dell'Unione europea n. L328/14 del 24 novembre 2006;
- **Direttiva 2004/41/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 21 aprile 2004** *"che abroga alcune direttive recanti norme sull'igiene dei prodotti alimentari e le disposizioni sanitarie per la produzione e la commercializzazione di determinati prodotti di origine animale destinati al consumo umano e che modifica le direttive 89/662/CEE e 92/118/CEE e la decisione 95/408/CE del Consiglio"*. G.U. dell'Unione europea n. L157/33 del 30 aprile 2004;
- **Direttiva 2003/114/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 22 dicembre 2003** *"che modifica la direttiva 95/2/CE relativa agli additivi alimentari diversi dai coloranti e dagli edulcoranti"*. G.U. dell'Unione europea n. L24/58 del 29 gennaio 2004;
- **Direttiva 2003/89/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 10 novembre 2003** *"che modifica la direttiva 2000/13/CE per quanto riguarda l'indicazione degli ingredienti contenuti nei prodotti alimentari"*. G.U. dell'Unione europea n. L308/15 del 25 novembre 2003;
- **Direttiva 2002/99/CE del Consiglio del 16 Dicembre 2002** *"che stabilisce norme di polizia sanitaria per la produzione, la trasformazione e l'introduzione di prodotti di origine animale destinati al consumo umano"*. G.U. delle Comunità europee n. L18/11 del 23 gennaio 2003;
- **Direttiva 2000/13/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 20 marzo 2000** *"relativa al ravvicinamento delle legislazioni degli Stati Membri concernenti l'etichettatura e la presentazione dei prodotti alimentari destinati al consumatore finale, nonché la relativa pubblicità"*. G.U. delle Comunità europee n. L109/29 del 6 maggio 2000;
- **Direttive 1999/2/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 22 febbraio 1999** *"relativa al ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri concernenti gli alimenti e i loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti"*. G.U. n. L66 del 13 marzo 1999;

- **Direttiva 98/6/CE** del Parlamento europeo e del Consiglio del 16 febbraio 1998 *“relativa alla protezione dei consumatori in materia di indicazione dei prezzi dei prodotti offerti ai consumatori”*. G.U. delle Comunità europee n. L80/27 del 18 marzo 1998;
- **Direttiva 95/2/CE** del Parlamento europeo e del Consiglio del 20 febbraio 1995 *“relativa agli additivi alimentari diversi dai coloranti e dagli edulcoranti”*. G.U. n. L61 del 18 marzo 1995;
- **Direttiva n. 91/493/CEE** del Consiglio del 22 luglio 1991 *“che stabilisce norme sanitarie applicabili alla produzione e alla commercializzazione dei prodotti della pesca”*. G.U. n. L268 del 24 settembre 1991;
- **Direttiva 90/496/CEE** del Consiglio del 24 settembre 1990 *“Relativa all’etichettatura nutrizionale dei prodotti alimentari”*. G.U. n. L 276 del 6 ottobre 1990;
- **Direttiva 79/112/CEE** del Consiglio, del 18 dicembre 1978 *“relativa al ravvicinamento delle legislazioni degli Stati Membri concernenti l’etichettatura e la presentazione dei prodotti alimentari destinati al consumatore finale, nonché la relativa pubblicità”*. G.U. n L33 dell' 8 febbraio 1979;
- **Legge 40/2007** del Parlamento Italiano del 2 aprile 2007 *“Conversione in legge, con modificazioni, del decreto-legge 31 gennaio 2007, n. 7, recante misure urgenti per la tutela dei consumatori, la promozione della concorrenza, lo sviluppo di attività economiche e la nascita di nuove imprese”*. G.U. n. 77 del 2 aprile 2007;
- **Regolamento di esecuzione (UE) N. 1012/2012** della Commissione del 5 novembre 2012 *“che modifica il regolamento (CE) n. 2074/2005 e il regolamento (CE) n. 1251/2008 per quanto riguarda l’elenco delle specie vettrici, le condizioni di polizia sanitaria e le condizioni di certificazione concernenti la sindrome ulcerativa epizootica e per quanto riguarda l’inserimento della Thailandia nell’elenco dei paesi terzi dai quali sono autorizzate le importazioni di determinati pesci e prodotti della pesca verso l’Unione”*. G.U. dell’Unione europea n. L306/1 del 6 novembre 2012;
- **Regolamento (UE) n. 432/2012** della Commissione del 16 maggio 2012 *“Relativo alla compilazione di un elenco di indicazioni sulla salute consentite sui prodotti alimentari, diverse da quelle facenti riferimento alla riduzione dei rischi di malattia e allo sviluppo e alla salute dei bambini ”*. G.U. dell’unione europea n. 136/1 del 25 maggio 2012;
- **Regolamento (UE) N. 16/2012** della Commissione dell’11 gennaio 2012 *“che modifica l’allegato II del regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda i requisiti relativi agli alimenti congelati di origine animale destinati al consumo umano”*. G.U. dell’Unione europea n. L8/29 del 12 gennaio 2012;
- **Regolamento (UE) n. 1169/2011** del Parlamento europeo e del Consiglio del 25 ottobre 2011 *“Relativo alla fornitura di informazioni sugli alimenti ai consumatori, che modifica i regolamenti (CE) n. 1924/2006 e (CE) n. 1925/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio e abroga la direttiva 87/250/CEE della Commissione, la direttiva 90/496/CEE del Consiglio, la direttiva 1999/10/CE della Commissione, la direttiva 2000/13/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, le direttive*

- 2002/67/CE e 2008/5/CE della Commissione e il regolamento (CE) n. 608/2004 della Commissione”. G.U. dell’Unione europea n. L304/18 del 22 novembre 2011;
- **Regolamento (UE) N. 809/2011** della Commissione dell’11 agosto 2011 “*che modifica il regolamento (CE) n. 2074/2005 per quanto riguarda la documentazione di accompagnamento di prodotti della pesca congelati importati direttamente da una nave frigorifero*”. G.U. dell’Unione europea n. L207/1 del 12 agosto 2011;
 - **Regolamento di esecuzione (UE) n. 404/2011** della Commissione dell’8 aprile 2011 “*recante modalità di applicazione del regolamento (CE) n. 1224/2009 del Consiglio che istituisce un regime di controllo comunitario per garantire il rispetto delle norme della politica comune della pesca*”. G.U. n. L112 del 30 aprile 2011;
 - **Regolamento CE n. 238/2010** della Commissione del 22 marzo 2010 “*che modifica l’allegato V del regolamento (CE) n. 1333/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda la prescrizione relativa all’etichettatura delle bevande con contenuto alcolico superiore all’1,2 % in volume e che contengono determinati coloranti alimentari*”. G.U. dell’Unione europea n. L75/17 del 23 marzo 2010;
 - **Regolamento (CE) N. 1162/2009** della Commissione del 30 novembre 2009 “*che fissa disposizioni transitorie per l’attuazione dei regolamenti del parlamento europeo e del Consiglio (CE) n. 853/2004, (CE) n. 854/2004 e (CE) n. 882/2004*”. G.U. dell’Unione europea n. L314/10 del 1 dicembre 2009;
 - **Regolamento (CE) n. 1224/2009** del Consiglio del 20 novembre 2009 “*che istituisce un regime di controllo comunitario per garantire il rispetto delle norme della politica comune della pesca, che modifica i regolamenti (CE) n. 847/96, (CE) n. 2371/2002, (CE) n. 811/2004, (CE) n. 768/2005, (CE) n. 2115/2005, (CE) n. 2166/2005, (CE) n. 388/2006, (CE) n. 509/2007, (CE) n. 676/2007, (CE) n. 1098/2007, (CE) n. 1300/2008, (CE) n. 1342/2008 e che abroga i regolamenti (CEE) n. 2847/93, (CE) n. 1627/94 e (CE) n. 1966/2006*”. G.U. dell’Unione europea n. L343/1 del 22 dicembre 2009;
 - **Regolamento (CE) N. 596/2009** del Parlamento europeo e del Consiglio del 18 giugno 2009, “*Che adegua alla decisione 1999/468/CE del Consiglio determinati atti soggetti alla procedura di cui all’articolo 251 del trattato, per quanto riguarda la procedura di regolamentazione con controllo*”. G.U. dell’Unione europea n. L188/14 del 18 luglio 2009;
 - **Regolamento (CE) N. 1251/2008** della Commissione del 12 dicembre 2008 “*recante modalità di esecuzione della direttiva 2006/88/CE per quanto riguarda le condizioni e le certificazioni necessarie per l’immissione sul mercato e l’importazione nella Comunità di animali d’acquacoltura e i relativi prodotti e che stabilisce un elenco di specie vettrici*”. G.U. dell’unione europea n. L337/41 del 16 dicembre 2008;
 - **Regolamento (CE) N. 1250/2008** della Commissione del 12 dicembre 2008 “*che modifica il regolamento (CE) n. 2074/2005 per quanto riguarda le condizioni di certificazione per le importazioni dei prodotti della pesca, molluschi bivalvi vivi, echinodermi, tunicati e gasteropodi marini destinati al consumo umano*”. G.U. dell’unione europea n. L337/31 del 16 dicembre 2008;

- **Regolamento (CE) N. 1022/2008** della Commissione del 17 ottobre 2008 “*recante modifica del regolamento (CE) n. 2074/2005 per quanto riguarda i valori limite di azoto basico volatile totale (ABVT) nei prodotti della pesca*”. G.U. dell’Unione europea n. L277/18 del 18 ottobre 2008;
- **Regolamento (CE) N. 1021/2008** della Commissione del 17 ottobre 2008 “*che modifica gli allegati I, II e III del regolamento (CE) n. 854/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio che stabilisce norme specifiche per l’organizzazione dei controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano e il regolamento (CE) n. 2076/2005 per quanto riguarda i molluschi bivalvi vivi, taluni prodotti della pesca e il personale assistente durante i controlli ufficiali nei macelli*”. G.U. dell’Unione europea n. L277/15 del 18 ottobre 2008;
- **Regolamento (CE) N. 1020/2008** della Commissione del 17 ottobre 2008 “*che modifica gli allegati II e III del regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale e il regolamento (CE) n. 2076/2005 per quanto riguarda la marchiatura d’identificazione, il latte crudo e i prodotti lattiero-caseari, le uova e gli ovoprodotti e taluni prodotti della pesca*”. G.U. dell’Unione europea n. L277/8 del 18 ottobre 2008;
- **Regolamento (CE) N. 1019/2008** della Commissione del 17 ottobre 2008 “*che modifica l’allegato II del regolamento (CE) n. 852/2004 del parlamento europeo e del Consiglio sull’igiene dei prodotti alimentari*”. G.U. dell’Unione europea n. L277/7 del 18 ottobre 2008;
- **Regolamento (CE) N. 202/2008** della Commissione del 4 marzo 2008 “*Che modifica il regolamento(CE) n. 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio riguardo al numero e ai nomi dei gruppi di esperti scientifici dell’Autorità europea per la sicurezza alimentare*”. G.U. dell’Unione europea n. L60/17 del 5 marzo 2008;
- **Regolamento (CE) N. 1441/ 2007** della Commissione del 5 dicembre 2007 “*che modifica il regolamento (CE) n. 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari*”. G.U. dell’Unione europea n. L322/12 del 7 dicembre 2007;
- **Regolamento (CE) n. 1925/2006** del Parlamento europeo e del Consiglio del 20 dicembre 2006 “*Sull’aggiunta di vitamine e minerali e di talune sostanze negli alimenti*”. G.U. dell’Unione europea n. 404/26 L del 30 dicembre 2006;
- **Regolamento (CE) n. 1924/2006** del Parlamento europeo e del Consiglio del 20 dicembre 2006 “*Relativo alle indicazioni nutrizionali e sulla salute fornite dai prodotti alimentari*”. G.U. dell’Unione europea n. 404/9 L del 30 dicembre 2006;
- **Regolamento (CE) n. 1881/2006** della Commissione del 19 dicembre 2006 che “*definisce i tenori massimi di taluni contaminanti presenti nei prodotti alimentari*”. G.U. dell’Unione europea n. L364/5 del 20 dicembre 2006;
- **Regolamento (CE) N. 1666/2006** della Commissione del 6 novembre 2006 “*recante modifica del regolamento CE n. 2076/2005 che fissa disposizioni transitorie per l’attuazione dei regolamenti del Parlamento europeo e del Consiglio (CE) n. 853/2004, (CE) n.854/2004 e (CE) n. 882/2004*”. G.U. dell’Unione europea n. L320/47 del 18 novembre 2006;

- **Regolamento (CE) N. 1664/2006** della Commissione del 6 novembre 2006 *“recante modifica del regolamento CE n. 2074/2005 per quanto riguarda le misure di attuazione per taluni prodotti di origine animale destinati al consumo umano e che abroga talune misure di attuazione”*. G.U. dell’Unione europea n. L320/13 del 18 novembre 2006;
- **Regolamento (CE) N. 1663/2006** della Commissione del 6 novembre 2006 *“recante modifica del regolamento CE n. 854/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio che stabilisce norme specifiche per l’organizzazione dei controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano”*. G.U. dell’Unione europea n. L320/11 del 18 novembre 2006;
- **Regolamento (CE) N. 1662/2006** della Commissione del 6 novembre 2006 *“recante modifica del regolamento CE n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale”*. G.U. dell’Unione europea n. L320/1 del 18 novembre 2006;
- **Regolamento (CE) N. 575/2006** della Commissione del 7 aprile 2006 *“Che modifica il regolamento(CE) n. 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio riguardo al numero e alla denominazione dei gruppi scientifici permanenti dell’Autorità europea per la sicurezza alimentare”*. G.U. dell’Unione europea n. L100/3 del 8 aprile 2006;
- **Regolamento (CE) N. 2075/2005** del Parlamento europeo e del Consiglio del 5 dicembre 2005 *“che definisce norme specifiche applicabili ai controlli ufficiali relativi alla presenza di Trichine nelle carni”*. G.U. dell’Unione europea n. L338/60 del 22 dicembre 2005;
- **Regolamento (CE) N. 2074/2005** del Parlamento europeo e del Consiglio del 5 dicembre 2005 *“recante modalità di attuazione relative ad alcuni prodotti di cui al regolamento (CE) N. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio e all’organizzazione di controlli ufficiali a norma dei regolamenti del Parlamento europeo e del Consiglio (CE) N. 854/2004 e (CE) N. 882/2004, deroga al regolamento (CE) N. 852/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio e modifica dei regolamenti (CE) N. 853/2004 e (CE) N. 854/2004”*. G.U. dell’Unione europea n. L338/27 del 22 dicembre 2005;
- **Regolamento (CE) N. 2073/2005** del Parlamento europeo e del Consiglio del 15 novembre 2005 *“sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari”*. G.U. dell’Unione europea n. L338/1 del 22 dicembre 2005;
- **Regolamento (CE) n. 790/2005** della Commissione del 25 maggio 2005 *“recante modifica del regolamento (CE) n. 2406/96 del Consiglio che stabilisce norme comuni di commercializzazione per taluni prodotti della pesca”*. G.U. dell’Unione europea n. L132/15 del 25 maggio 2005;
- **Regolamento (CE) N. 183/2005** del Parlamento europeo e del Consiglio del 12 gennaio 2005 *“che stabilisce requisiti per l’igiene dei mangimi”*. G.U. dell’Unione europea n. L35/1 del 8 febbraio 2005;
- **Regolamento (CE) N. 1935/2004** del Parlamento europeo e del Consiglio del 27 ottobre 2004 *“riguardante i materiali e gli oggetti destinati a venire in contatto con i prodotti alimentari e che abroga le direttive 80/590/CEE e 89/109/CEE”*. G.U. dell’Unione europea n. L338/4 del 13 novembre 2004;

- **Regolamento (CE) N. 882/2004** del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 “*relativo ai controlli ufficiali destinati a verificare la conformità della normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali*”. G.U. dell’Unione europea n. L191 del 28 maggio 2004;
- **Regolamento (CE) N. 854/2004** del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 “*che stabilisce norme specifiche per l’organizzazione dei controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano*”. G.U. dell’Unione europea n. L226/83 del 25 giugno 2004;
- **Regolamento (CE) N. 853/2004** del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 “*che stabilisce norme specifiche in materia di igiene degli alimenti di origine animale*”. G.U. dell’Unione europea n. L139/55 del 30 aprile 2004;
- **Regolamento (CE) N. 852/2004** del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 “*sull’igiene dei prodotti alimentari*”. G.U. dell’Unione europea n. L139/1 del 30 aprile 2004;
- **Regolamento (CE) n. 1642/2003** del Parlamento europeo e del Consiglio del 22 luglio 2003 “*Che modifica il regolamento(CE) n. 178/2002 che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l’Autorità per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare*”. G.U. dell’Unione europea n. L245/4 del 29 settembre 2003;
- **Regolamento (CE) n. 178/2002** del Parlamento europeo e del Consiglio, del 28 gennaio 2002 “*che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l’Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare*”. G.U. delle Comunità Europee n. L31/1 del 1 febbraio 2002;
- **Regolamento (CE) n. 2495/2001** della Commissione del 19 dicembre 2001 “*recante modifica del regolamento (CE) n. 2406/96 del Consiglio che stabilisce norme comuni di commercializzazione per taluni prodotti della pesca*”. G.U. delle Comunità europee n. L337/23 del 20 dicembre 2001;
- **Regolamento (CE) n. 2065/2001** della Commissione del 22 ottobre 2001 “*che stabilisce le modalità d’applicazione del regolamento (CE) n. 104/2000 del Consiglio per quanto concerne l’informazione dei consumatori nel settore dei prodotti della pesca e dell’acquacoltura*”. G.U. delle Comunità europee n. 278 del 23 ottobre 2001;
- **Regolamento (CE) n. 104/2000** del Consiglio del 17 dicembre 1999 “*relativo all’organizzazione comune dei mercati nel settore dei prodotti della pesca e dell’acquacoltura*”. G.U. delle Comunità europee n. L17/22 del 21 gennaio 2000;
- **Regolamento (CE) n. 2578/2000** del Consiglio del 17 novembre 2000 “*recante modifica del regolamento (CE) n. 2406/96, che stabilisce norme comuni di commercializzazione per taluni prodotti della pesca*”. G.U. delle Comunità europee n. L298 del 25 novembre 2000;
- **Regolamento (CE) n. 323/97** della Commissione del 21 febbraio 1997 “*recante modifica del regolamento (CE) n. 2406/96 del Consiglio che stabilisce norme*

comuni di commercializzazione per taluni prodotti della pesca". G.U. n. L52 del 22 febbraio 1997;

- **Regolamento (CE) n. 2406/96** del Consiglio del 26 novembre 1996 *"che stabilisce norme comuni di commercializzazione per taluni prodotti della pesca"*. G.U. n. L334 del 23 dicembre 1996;
- **Regolamento (CEE) n. 2092/91** del Consiglio del 24 giugno 1991 *"relativo al metodo di produzione biologico di prodotti agricoli e alla indicazione di tale metodo sui prodotti agricoli e sulle derrate alimentari"*. G. U. n. L198 del 22 luglio 1991;
- **Regolamento (CE) n. 33/89** del Consiglio del 5 gennaio 1989 G.U. n. L5 del 7 gennaio 1989;
- **Regolamento (CE) n. 103/76** del Consiglio del 19 gennaio 1976 *"che stabilisce norme comuni di commercializzazione per alcuni pesci freschi o refrigerati"*. G.U. n. L020 del 28 gennaio 1976;
- **UNI EN 601:2007** *massimo valore del contenuto di massa degli elementi di lega e delle impurità di materiali fusi e oggetti destinati al contatto con alimenti, in alluminio e leghe di alluminio*. Gennaio 2007;

RINGRAZIAMENTI

Desidero innanzitutto ringraziare la Prof.ssa Alessandra Guidi, il Dott. Andrea Armani e il Dott. Lorenzo Castigliego, sia da un punto di vista morale che materiale, da una parte per i loro preziosi e stimolanti insegnamenti, per mezzo dei quali sono riusciti a trasmettermi una forte passione per questo settore, dall'altra per le molte ore che hanno dedicato alla mia tesi, nonostante i loro numerosissimi impegni. Li ringrazio inoltre per avermi sempre emotivamente sostenuta durante il mio percorso universitario, anche e soprattutto nei momenti più difficili, e di avere sempre riposto molta fiducia in me. Altrettanta gratitudine va a tutte le persone che in laboratorio mi sono state vicine, contribuendo in maniera determinante alla stesura della mia tesi. Tra queste Lara, Priscilla, Lisa, Veronica e Xiong, i quali, ognuno a modo suo, ha dedicato parte del suo tempo al mio progetto. In particolare mi sento di ringraziare Lara, per il costante impegno e la forte passione che mette quotidianamente nel suo lavoro e per la disponibilità che ha sempre avuto nei miei confronti; in questi anni ho avuto modo di conoscerla, e non credo di esagerare se affermo che sia una delle persone più valide, da un punto di vista sia professionale che umano, che abbia mai avuto la fortuna di incontrare.

Ringrazio poi i miei “colleghi” tesisti Francesco, Filippo, Eugeniya, Nino e Riccardo: abbiamo scelto di intraprendere lo stesso percorso, mossi dalla stessa passione per questa professione, e in qualche modo siamo gli uni legati agli altri perché abbiamo condiviso i medesimi momenti difficili ai quali spesso questa scelta ci ha messo davanti.

Ringrazio la mia famiglia, mamma, papà, nonne e zii, per il loro amore e sostegno; i miei amici e tutte le persone importanti che mi sono state vicine in questi anni. Non mi metterò, a tal proposito, a buttar giù una lista sterile di nomi (anche perché, ahimè, l'età avanza ed avrei paura di dimenticarne alcuni); chi c'è stato, lo sa, e per questo lo ringrazio e lo porterò sempre nel cuore.